

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Microbiología



Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Fernando Lázaro Perona

**Aplicación de técnicas de qPCR para la cuantificación
relativa de enterobacterias**



 **Comunidad de Madrid**



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Microbiología



Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Fernando Lázaro Perona

Bajo la dirección de los doctores:

Jesús Mingorance Cruz

Julio García Rodríguez

Realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital
Universitario La Paz



 **Comunidad de Madrid**



RESUMEN

La colonización por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPCs) durante el ingreso hospitalario es un problema creciente a nivel mundial. Aunque el proceso de colonización es silente, los portadores rectales de EPCs tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones por estas bacterias y por tanto es necesario contener su propagación en los hospitales. Para ello, se implantan medidas higiénicas, la detección de portadores asintomáticos mediante el cultivo de torundas rectales y en ocasiones estrategias de descolonización como los trasplantes fecales, el uso de antibióticos orales no absorbibles o la administración de probióticos. En la práctica habitual, los resultados de colonización o el éxito en la descolonización se expresan como un resultado dicotómico (positivo o negativo).

En esta tesis planteamos estudiar la carga intestinal de *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 (KpOXA-48) en pacientes colonizados mediante el uso del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ basado en qPCR. Este método nos ha permitido diferenciar aquellos pacientes en los que su microbiota ha sido totalmente desplazada por KpOXA-48 de aquellos en los que estas bacterias suponen una pequeña fracción del total de bacterias intestinales. Además, analizamos aquellos factores que pueden modificar la carga intestinal de estas bacterias y sus posibles consecuencias clínicas. Igualmente, hemos aplicado este método en un ensayo clínico piloto de descolonización rectal de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 mediante la administración de probióticos y prebióticos para determinar los efectos del tratamiento más allá de la descolonización absoluta. Y finalmente abrimos la posibilidad de aplicar esta técnica en otros contextos como el seguimiento de la carga rectal de *Serratia marcescens* durante un brote en varias unidades de neonatos.

ABSTRACT

Intestinal colonization by carbapenemase-producing enterobacteria (CPE) during hospitalization is an increasing problem worldwide. Although rectal colonization is silent, carriers are at risk to develop an infection and therefore avoiding dissemination is a priority for healthcare facilities. In order to do that, measures as strict hygiene and rapid detection of asymptomatic carriers are frequently applied while some groups are trying decolonization strategies based on fecal transplantation, administration of non-absorbable oral antibiotics or the intake of probiotics. As a general rule, colonization is considered as positive or negative regarding the culture results, but as we show in this work, there are important differences in the bacterial load between different carriers.

In this thesis we study the intestinal load of OXA-48-producer *Klebsiella pneumoniae* (KpOXA-48) by applying the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and provide evidence that while some patients microbiota has been almost totally replace by KpOXA-48 in others this bacterium only represents a fraction of the total bacteria. In addition, we have studied the factors that modify the bacterial intestinal load and their clinical implications. Furthermore, we applied this method during a pilot clinical trial that aimed to decolonize OXA-48-producer enterobacteria carriers by administrating probiotics and prebiotics in order to study the treatment effect beyond the absolute decolonization objective.

Finally, we open up the possibility of using this method in other contexts such as following up the intestinal load of *Serratia marcescens* in several patients during a neonatal outbreak.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer esta tesis doctoral a mis directores el Dr. Jesús Mingorance Cruz y el Dr. Julio García Rodríguez. Al primero, por su inestimable y continuo apoyo, por todo lo aprendido durante estos años y por su capacidad para contagiar a los que le rodean su amor por la ciencia. Al segundo, por haber confiado en mí, por sus valiosos consejos y por su dedicación y esfuerzo para que éste y otros proyectos salieran a delante. Ambos son mis referentes por su pasión hacia la microbiología, profesionalidad y espíritu combativo.

Igualmente, quiero agradecer esta tesis a todo el Servicio de Microbiología y a la Unidad de Infecciosas del Hospital La Paz, y especialmente a todos los que han colaborado directa o indirectamente en el desarrollo de todas las partes que componen esta tesis pero que, por ser tantos, me es imposible citar aquí.

También, y con mucho cariño, a mis compañeros de residencia, por los lazos forjados, por tantas risas, y por ser siempre un apoyo en lo bueno y en lo malo. Gracias.

Mi último agradecimiento es para mi familia, y muy especialmente para mi mujer, Clara, que sin su apoyo incondicional esta tesis tampoco habría sido posible.

A todos,

Gracias

ABREVIATURAS Y SIGLAS

CR: Carga rectal

BLEEs Betalactamasas de Espectro Extendido

EPCs: Enterobacterias productoras de carbapenemasa

EP-OXA: Enterobacteria productora de betalactamasa OXA-48

EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

KpOXA-48: *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa OXA-48

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MLST: Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus Sequence Typing)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)

REP-PCR: PCR de secuencias repetitivas palindrómicas (Repetitive element palindromic PCR)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Enterobacterias productoras de carbapenemasas
- 1.2. EPCs en el medio hospitalario
- 1.3. Epidemiología hospitalaria y control de brotes
- 1.4. Otros brotes: *Serratia marcescens*
- 1.5. Estimación de la carga intestinal de bacterias: método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1. Contexto de los estudios
- 3.2. Datos Clínicos
- 3.3. Semicuantificación mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$
- 3.4. Ensayo clínico piloto DESPROBIOXA
- 3.5. Cuantificación de la carga intestinal de *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados
- 3.6. Carga relativa de *Serratia marcescens* durante un brote en unidades neonatales
- 3.7. Validación de los ensayos de qPCR
- 3.8. Semicuantificación en torundas rectales
- 3.9. Análisis estadístico

4. RESULTADOS

- 4.1. Ensayo clínico piloto DESPROBIOXA
- 4.2. Cuantificación de la carga intestinal de *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados
- 4.3. Carga relativa de *Serratia marcescens* durante un brote en unidades neonatales

5. DISCUSIÓN

- 5.1. Ensayo clínico piloto DESPROBIOXA
- 5.2. Cuantificación de la carga intestinal de *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados
- 5.3. Carga relativa de *Serratia marcescens* durante un brote en unidades neonatales
- 5.4. Discusión general

6. CONCLUSIONES

7. APÉNDICE

8. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enterobacterias productoras de carbapenemasas

El aumento global del consumo de antibióticos, tanto en salud humana como animal, ha dado lugar a la selección de bacterias multirresistentes para las cuales la mayoría de los antibióticos de uso común resultan ineficaces [1]. Entre ellas, las enterobacterias productoras de carbapenemasas (**EPCs**) representan una amenaza a nivel global y reducir su diseminación supone uno de los retos de la humanidad para las próximas décadas [2].

Estas enterobacterias se caracterizan por presentar múltiples mecanismos de resistencia que les permiten prosperar en entornos con una fuerte presión antibiótica como hospitales, explotaciones ganaderas o aguas residuales. El desarrollo de la resistencia antibiótica se produce por dos vías: la acumulación de mutaciones cromosómicas [3] y, especialmente, la adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones capaces albergar múltiples genes de resistencia [4,5]. Además, estos elementos móviles son capaces de transferirse horizontalmente entre distintas especies y géneros de enterobacterias, recombinarse o adquirir nuevos genes de resistencia, por lo que su presencia puede afectar a todo un ecosistema bacteriano.

1.2 EPCs en el medio hospitalario

En el entorno hospitalario, las EPCs actúan generalmente como patógenos oportunistas, afectando especialmente a pacientes críticos e inmunodeprimidos [6] pero también a aquellos que han sido sometidos a procedimientos invasivos o que presentan varias comorbilidades. Como paso previo a la infección, las EPCs suelen colonizar el intestino de los pacientes de manera asintomática. Estos a su vez, pueden actuar como reservorios para la transmisión a otros pacientes, bien a través del personal sanitario o contaminando fómites [7,8]. Por tanto, aunque la colonización es asintomática no es inocua. Los

pacientes colonizados presentan un mayor riesgo para desarrollar infecciones por EPCs incluso meses después de recibir el alta hospitalaria [9].

Para poder colonizar el tracto intestinal, las EPCs deben competir con la microbiota endógena del paciente por un mismo nicho. En personas jóvenes y sanas, la microbiota intestinal suele proveer cierta resistencia a la colonización por este tipo de bacterias mientras que en personas de avanzada edad esta microbiota se modifica, incrementando el riesgo de ser colonizado [10]. Además, aquellos factores que pueden alterar la microbiota intestinal como son el uso de antibióticos de amplio espectro, enfermedades crónicas, hospitalizaciones prolongadas o el contacto estrecho con el sistema sanitario también aumentan el riesgo de colonización por EPCs [11-13]. Es de esperar que cada uno de estos factores altere en distinto grado la microbiota, y por tanto, contribuya de manera distinta a la intensidad con que las EPCs sean capaces de desplazar a la microbiota endógena.

1.3 Epidemiología Hospitalaria y control de brotes

En algunos hospitales las infecciones por EPCs aparecen como casos aislados o pequeños brotes limitados en el tiempo [14]. Sin embargo, en la actualidad muchos se enfrentan a una situación de endemia, en la que la presencia de pacientes tanto infectados como colonizados por estas bacterias es continua en el tiempo [15]. En estos casos, la seguridad del paciente se ve seriamente comprometida, generando una mayor morbilidad y mortalidad y prolongando los tiempos de ingreso a la vez que se incrementan los costes hospitalarios [16].

En el Hospital Universitario La Paz, la presencia de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 (**KpOXA-48**) es endémica. Esta carbapenemasa se encuentra codificada en un plásmido con distribución mundial y capaz de transmitirse con facilidad

in vivo [17-19] entre las distintas enterobacterias presentes en el intestino de los pacientes colonizados. Las primeras cepas aisladas, en el año 2011, pertenecían al secuenciotipo (MLST) ST405. Durante los años siguientes, este secuenciotipo fue mayormente desplazado por el ST11 y en la actualidad el número de secuenciotipos presentes de forma endémica en el hospital sigue aumentando, lo que sugiere que desde el inicio del brote hasta ahora se han ido produciendo múltiples introducciones de distintos clones de KpOXA-48.

Uno de los ejes del control de brotes nosocomiales por EPCs es el cribado rutinario de pacientes para la detección de portadores intestinales mediante torundas rectales [20,21] y en caso de resultar positivo, proceder a su aislamiento y limpieza de la habitación. Estos cribados epidemiológicos se basan mayoritariamente en el cultivo de torundas rectales en medios selectivos y/o la detección mediante PCR del gen que codifica la carbapenemasa diana. Estas técnicas ofrecen resultados cualitativos (positivo/negativo), pero no permiten obtener información respecto a la proporción (o carga intestinal) de bacterias que portan el gen de resistencia o de la propia cepa epidémica presente en el intestino del paciente.

Dentro de las medidas alternativas para el control de portadores se encuentran las estrategias de descolonización intestinal [22,23]. Para lograrlo, se ha intentado restablecer la microbiota intestinal normal mediante el trasplante de heces de personas sanas [24-26], la descontaminación selectiva de EPCs mediante la administración oral de antibióticos no absorbibles contra bacilos gram negativos (normalmente colistina y aminoglucósidos) o incluso ambas estrategias a la vez [27]. Aunque existe el riesgo de generar un aumento de la resistencia antibiótica, algunos estudios sugieren que ésta podría no ser significativa [28,29].

Otra estrategia propuesta consiste en desplazar las EPCs promoviendo la colonización intestinal por bacterias no patógenas [30]. Estas bacterias, llamadas probióticos, son

microorganismos vivos (*Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*) las cuales podrían producir un efecto beneficioso para el paciente.

Estos probióticos pueden administrarse conjuntamente con los llamados prebióticos, compuestos no absorbibles que pueden ser metabolizados por la microbiota comensal y no por las cepas nosocomiales, y que podría favorecer el desplazamiento de las EPCs.

Hasta la fecha, los intentos de utilizar este procedimiento para erradicar las EPCs han sido, generalmente, infructuosos [31,32]. Sin embargo, se sabe que algunos probióticos pueden bloquear la colonización por patógenos como *S. aureus* a través de determinados lipopéptidos [33]. Uno de los problemas, de este tipo de estudios es que no existe ninguna estandarización en cuanto a la dosis, las cepas utilizadas o el tiempo de administración. Además, cuando medimos la eficacia del tratamiento usando las mismas técnicas que las usadas en el cribado de portadores (cultivos o PCR para detectar los genes codificantes de carbapenemasas) perdemos información respecto a otros posibles efectos del tratamiento, como su posible impacto sobre la proporción intestinal de EPCs.

1.4 Otros brotes: *Serratia marcescens*

Un caso particular de brotes nosocomiales por enterobacterias lo constituyen los brotes por *S. marcescens* en UCIs neonatales [34]. *S. marcescens* es un bacilo gram negativo ubicuo considerado poco virulento que forma parte de la microbiota normal de los seres humanos. Estos brotes están producidos, en la mayoría de los casos, por cepas salvajes carentes de mecanismos de resistencia exógenos. En este sentido se sabe que el medio hospitalario juega un papel fundamental en la transmisión de esta bacteria y, al igual que ocurría con las EPCs, durante un brote por *S. marcescens* la mayoría de los neonatos son colonizados de manera asintomática.

La prematuridad, la hospitalización prolongada y la administración de antibióticos [35-37] puede favorecer la colonización por *S. marcescens*. Sin embargo, la colonización en neonatos se ve además favorecida por la inmadurez del sistema inmune y la falta de una microbiota madura. Esto a su vez da lugar a mayores tasas de bacteriemias e infecciones respiratorias además de otras infecciones.

En muchos casos el inicio de este tipo de brotes se debe a la presencia de materiales contaminados [38,39] si bien es frecuente no encontrar el origen del mismo. Por tanto, al igual que con las EPCs el control de los brotes se basa en la detección del foco, limpieza del entorno y la detección y aislamiento de pacientes colonizados o infectados.

Una de las principales incógnitas de la aparición de estos brotes resulta del hecho de que al ser *S. marcescens* una bacteria comensal, puede aislarse de manera habitual a partir de las torundas rectales de neonatos ingresados sin que esto suponga un riesgo para otros pacientes. Sin embargo, en ocasiones producen brotes explosivos, que además suelen ser policlonales.

1.5 Estimación de la carga intestinal de bacterias: método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La proporción de EPCs (u otras enterobacterias) en la microbiota intestinal podría ser un factor importante en el riesgo de infección, la facilidad de diseminación dentro de las unidades hospitalarias o incluso afectar al tiempo transcurrido hasta la descolonización espontánea. En este sentido, algunos estudios han señalado a la carga intestinal como factor de riesgo para desarrollar bacteriemias [40,41] o su relación directa con el nivel de contaminación del entorno del paciente [42].

Desde hace años se han desarrollado diversos métodos que permiten estimar la composición bacteriana de la microbiota intestinal. Mientras que inicialmente se basaban

en el cultivo de heces [43,44] y recuento visual de colonias en la actualidad se prefieren las técnicas de biología molecular [45].

Los principales problemas a la hora de medir la composición del microbioma intestinal son: la falta de estandarización de las técnicas y la heterogeneidad de las muestras de partida [46-48]. La dificultad para conseguir homogeneizar las muestras hace que, en la mayoría de los casos, se prefiera expresar los resultados como una cuantificación relativa a la población bacteriana total en vez de una cuantificación absoluta. El resumen de las principales técnicas utilizadas y sus ventajas e inconvenientes se resume en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Técnicas utilizadas para el estudio de poblaciones microbianas

Principio de la técnica	Ventajas	Inconvenientes
Cultivo en medio agar	<ul style="list-style-type: none"> • Permite aislar las cepas • Bajo coste 	<ul style="list-style-type: none"> • Laborioso • Difícil estandarizar • Recuento visual • No todas las bacterias son cultivables • Difícil identificar cepas de interés
qPCR		
Curvas estándar	<ul style="list-style-type: none"> • Necesarias para determinar características de la qPCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de realizar una curva estándar en cada ensayo • Errores en la curva estándar son muy comunes

Método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor escalabilidad • Mayor precisión • Menos trabajo • Menor coste 	<ul style="list-style-type: none"> • Diferencias en la eficiencia entre la diana y la referencia pueden generar errores importantes
Secuenciación masiva		
Amplificación gen 16S rRNA	<ul style="list-style-type: none"> • Permite estudiar la composición del microbioma • Permite analizar la diversidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidad en los resultados • No siempre permite identificar especies • No permite identificar cepas • No permite cuantificar genes de resistencia • Mayor coste • Complejidad técnica
Metagenómica	<ul style="list-style-type: none"> • Menor sesgo que el microbioma • Permite estudiar otros microorganismos (parásitos, virus, fagos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil de interpretar • Coste muy elevado • Menor sensibilidad

Recientemente, la mayoría de los estudios se han centrado en el estudio del microbioma mediante la amplificación genómica del gen del ARNr 16S. Esta técnica, si bien ha resultado de gran utilidad para comprender la composición y diversidad del microbioma

intestinal ante muchas circunstancias, presenta ciertos inconvenientes: Resulta imprecisa a la hora de determinar la composición intestinal a nivel de especie y no permite determinar la proporción en la microbiota de bacterias portadoras de genes de resistencia.

Una de las alternativas para el estudio de la población de enterobacterias portadoras de genes de resistencia es su cuantificación relativa mediante técnicas de qPCR. Dentro de las técnicas de cuantificación relativa basadas en qPCR ha cobrado especial relevancia aquellas basadas en el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [49]. Este método se ha utilizado desde hace años para estudios de expresión genética de RNA mensajero (ARNm) [50], resultando especialmente útil en casos en los que exista un gen con una tasa de expresión constante que pueda ser usada como referencia del gen diana. El éxito de esta técnica se debe principalmente a su sencillez, escalabilidad, facilidad de interpretación y bajo coste.

Su uso en el campo de la microbiología es más reciente [51-53], generalmente con la intención de lograr una cuantificación relativa de una determinada cepa o gen de resistencia. Al carecer de un gen de referencia que se encuentre en una cantidad constante o conocida, estas técnicas usan como referencia el gen del ARNr 16S.

El uso del gen del ARNr 16S como gen de referencia ofrece ciertas ventajas e inconvenientes; la principal ventaja es su presencia en todas las bacterias y por tanto es posible expresar la relación de cualquier otro gen diana en relación a este. La principal desventaja reside en que el número de copias de este gen es específico de cada especie bacteriana y, por tanto, a pesar de que para la mayoría de los microbiomas el número de copias medio debería ser relativamente estable, en los casos de microbiomas con muy baja diversidad, el número de copias medio podría alterarse significativamente.

Por tanto, esta técnica permite estudiar de forma específica la proporción de un gen diana en relación a la población bacteriana total. Siendo el gen diana un gen de resistencia o una secuencia específica del genoma de una bacteria.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO: Estudiar la aplicabilidad los métodos de qPCR para determinar la carga intestinal de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 y *Serratia marcescens* en pacientes colonizados.

OBJETIVOS SECUNDARIOS: Analizar qué factores pueden modificar la carga intestinal de estas bacterias y su posible impacto sobre la salud. Incluyendo:

1. Analizar el efecto de la administración de lactulosa y lactitol durante 3 semanas en la carga intestinal relativa de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48.
2. Estudiar la población de enterobacterias portadoras del gen *bla*OXA-48 presentes en pacientes que estuvieron colonizados por *K. pneumoniae* OXA-48 durante un ingreso anterior.
3. Estudiar la carga relativa de *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 y sus clones mayoritarios en pacientes hospitalizados. Incluyendo los factores que pueden modificarla y sus posibles consecuencias.
4. Estudiar la evolución de la carga relativa de *S. marcescens* durante un brote en una UCI neonatal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Contexto de los estudios

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo íntegramente a partir de muestras recogidas dentro del Hospital Universitario La Paz a partir de 3 estudios distintos que se realizaron entre 2014 y 2019, el ensayo clínico DESPROBIOXA, el proyecto FIS “Análisis cuantitativo de la colonización intestinal por enterobacterias productoras de carbapenemasas” (PI16-01209), y el estudio de un brote por *S. marcescens* en una UCI de neonatos. En ella se recoge los resultados obtenidos mediante la aplicación de las técnicas de qPCR a la semicuantificación intestinal de bacterias y genes de resistencia en pacientes colonizados en distintos contextos clínicos:

- El ensayo DESPROBIOXA se realizó entre el año 2014 y 2015 y su objetivo principal era lograr la descolonización intestinal de pacientes colonizados por *K. pneumoniae* OXA-48 durante un ingreso anterior. La aplicación de las técnicas de qPCR a este ensayo tuvo como objetivo cuantificar el efecto del tratamiento administrado a los pacientes sobre la población intestinal de enterobacterias productoras de la carbapenemasa OXA-48 (**EP-OXA**). Además, este estudio sirvió para estudiar la dinámica de persistencia del plásmido portador del gen *bla*OXA-48 en pacientes colonizados en ingresos anteriores.
- El proyecto FIS PI16-01209 se desarrolló entre los años 2017 y 2019. En este proyecto se utilizaron las técnicas de qPCR para determinar la variabilidad en el grado de colonización por *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados y analizar la asociación entre dicho grado de colonización y los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes.
- Por último, en el año 2019 se realizó un breve análisis de la evolución de la carga relativa de *S. marcescens* a lo largo del tiempo en neonatos ingresados en el Hospital La Paz durante un brote por dicha bacteria.

3.2 Datos Clínicos

Los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes se analizaron de manera retrospectiva usando el sistema informático del hospital. La recuperación de dichos datos fue aprobada por el comité ético del hospital.

3.3 Semicuantificación mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

En qPCR, el ciclo en el cual la señal fluorescente alcanza el umbral de detección (Ct) es proporcional al número de copias del ADN diana en la muestra problema. Por lo tanto, podemos estimar la proporción de un gen diana respecto a otro (referencia), a partir de la diferencia en sus Ct s mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ [49]. Para dar significado a estos valores, esta proporción se expresa generalmente en relación a una segunda muestra (calibrador) la cual presenta una proporción constante y conocida de los genes diana y referencia. **Este método es conocido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.** El primer ΔCt expresa la diferencia entre los Ct s del gen de referencia y el gen diana y el segundo, la diferencia entre los ΔCt obtenido de una muestra problema y un calibrador.

En nuestro caso, para estudiar la carga intestinal relativa de un determinado gen o cepa bacteriana podemos usar como referencia el gen del ARNr 16S presente en todas las células bacterianas y como calibrador un cultivo puro de *K. pneumoniae* OXA-48 o *S. marcescens* (Ecuación 1).

$$\Delta\Delta Ct_{OXA-48} = (Ct_{OXA-48} - Ct_{16SrRNA})_{\text{muestra problema}} - (Ct_{OXA-48} - Ct_{16SrRNA})_{\text{calibrador}}$$

$$\Delta\Delta Ct_{ST11} = (Ct_{ST11} - Ct_{16SrRNA})_{\text{muestra problema}} - (Ct_{ST11} - Ct_{16SrRNA})_{\text{calibrador}}$$

$$\Delta\Delta Ct_{ST405} = (Ct_{ST405} - Ct_{16SrRNA})_{\text{muestra problema}} - (Ct_{ST405} - Ct_{16SrRNA})_{\text{calibrador}}$$

$$\Delta\Delta Ct_{Sm} = (Ct_{Sm} - Ct_{16SrRNA})_{\text{muestra problema}} - (Ct_{Sm} - Ct_{16SrRNA})_{\text{calibrador}}$$

Ecuación 1.

Para poder usar este método correctamente se han de cumplir tres requisitos; las eficiencias de todas las qPCRs deben ser similares y preferiblemente superiores al 80% y la dilución del ADN no debería influir en el resultado del ΔC_t . Por facilitar los cálculos, los resultados son expresados como el logaritmo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que en adelante se denominará **Carga Relativa (CR)**.

Así pues, en los pacientes colonizados por EP-OXA, consideramos la proporción del gen *blaOXA-48* (**CR_{OXA-48}**) como un marcador indirecto de la proporción de enterobacterias portadoras del gen *blaOXA-48* con respecto a la población bacteriana total.

Hay que tener en cuenta que el número de copias del gen de referencia, el ARNr 16S, es variable entre las distintas especies. Sin embargo, en promedio, las bacterias intestinales tienen 4 copias del gen ARNr 16S mientras que > del 97% de las enterobacterias presentan entre 7-8 copias del mismo, según la base de datos *rrnDB* (<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>) [54].

En este sentido, los valores cercanos a 0 representarían una proporción aproximada de 1:1 y, por tanto, una microbiota totalmente dominada por EP-OXA. Los valores inferiores representarían en escala logarítmica los distintos grados de colonización.

CR _{OXA-48}	0	-1	-2	-3	-4	-5
Proporción aproximada EP-OXA/Bacterias totales	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000

Se aplican los mismos criterios para la carga relativa del clon ST11 (CR_{ST11}) y el ST405 (CR_{ST405}) y *S. marcescens* (CR_{Sm}).

En el caso particular de los pacientes colonizados por EP-OXA, los valores por encima de 0 pueden darse en las circunstancias de extrema colonización en las que además las cepas dominantes posean un alto número de copias del plásmido portador del gen *bla*OXA-48.

3. 4 Ensayo clínico piloto DESPROBIOXA

Diseño del estudio

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de la administración oral de probióticos (Infloran Berna®, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*, 2x10⁹ CFU tid – po) y prebióticos (Emportal, lactitol 10 g tid) durante 3 semanas para lograr la descolonización intestinal de *K.pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48. Para ello se diseñó un ensayo clínico de brazo único cuyos participantes debían ser portadores de KpOXA-48. El ensayo fue registrado en EudraCT (2014-000449-65) y ClinicalTrials.gov (NCT02307383).

Los candidatos a participar en el estudio fueron pacientes no hospitalizados de entre 18 y 75 años que hubieran sido colonizados por KpOXA-48 durante un ingreso previo (al menos un mes previo al reclutamiento) y que siguieran colonizados por esta bacteria en el momento del estudio. Posteriormente, tras los resultados preliminares se decidió incluir a pacientes colonizados por EP-OXA.

Los criterios de exclusión incluían hospitalización debido a un proceso agudo, deterioro importante del estado de salud, tratamiento antibiótico por vía sistémica o administración de glucocorticoides en el mes previo al ensayo. Igualmente se excluyeron aquellos candidatos con diarrea en el mes previo al ensayo o alergia/intolerancia al lactitol, lactulosa o los probióticos. Otros criterios de exclusión fueron alteraciones electrolíticas ($K^+ < 3$ mEq/L, $Mg^{++} < 1.8$ mEq/L, $Ca^{++} < 8$ mg/dL), neutropenia ($< 1,00 \times 10^3 / \mu L$), quimioterapia o tratamiento inmunosupresor, disfunción hepática (ASAT /ALAT > 5

veces el límite superior, AP > 3 veces el límite superior, o bilirrubina > 2 mg/dl), fallo renal crónico (GFR < 30ml/min), diabetes mal controlada (HbA1c > 8 mmol/mol) prótesis endovascular y valvulopatía severa.

Los sujetos fueron reclutados mediante llamada telefónica y posterior entrevista personal. Todos los candidatos tuvieron que firmar el consentimiento informado de forma previa a su participación.

El ensayo fue diseñado de acuerdo con las guías clínicas actuales y los requisitos regulatorios de la US Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento, aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario La Paz (PI4131) y la Agencia Española del Medicamento y llevado a cabo de acuerdo con la Conferencia Internacional de Armonización/Guías de buenas prácticas clínicas y los principios de la Declaración de Helsinki.

Procedimientos del estudio

Se programaron una serie de visitas durante la duración del ensayo. Estas consistieron primero en una visita para el cribaje inicial y posteriormente una visita semanal durante 6 semanas (3 semanas de intervención y 3 semanas de seguimiento). Por último, se realizó una visita final a la sexta semana de finalizar el tratamiento. En la visita de cribado se tomó una torunda rectal, mientras que en las semanas posteriores se solicitaron muestras de heces. En los pacientes con cribado positivo para cualquier EP-OXA se planeó una segunda visita para comenzar el ensayo.

Para poder detectar posibles alteraciones de la función hepática y renal, el hemograma o alteraciones electrolíticas se realizaron dos análisis de sangre, uno durante el cribado y otro al finalizar el tratamiento. La seguridad y la tolerabilidad se evaluaron de forma semanal desde el inicio del tratamiento con cada visita médica.

El objetivo primario fue determinar la erradicación gastrointestinal sostenida de EP-OXA a las 6 semanas post-tratamiento. Los objetivos secundarios fueron la erradicación gastrointestinal de EP-OXA al finalizar el tratamiento y 3 semanas después de finalizar del tratamiento.

Los efectos en la colonización intestinal de EP-OXA se monitorizaron semanalmente durante el tratamiento y las 3 semanas posteriores mediante las muestras de heces entregadas en cada visita (**Figura 1**).

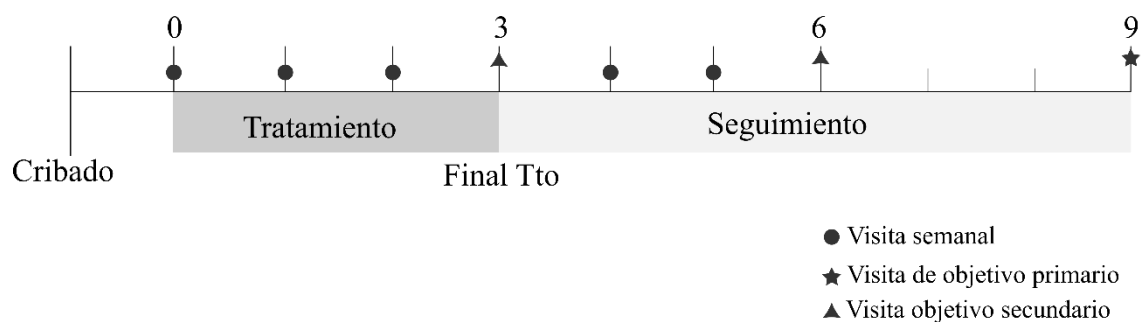


Figura 1. Esquema de trabajo y objetivos del ensayo clínico.

Obtención de muestras

Se recogieron torundas rectales y muestras de heces de veintidós voluntarios previamente hospitalizados que cumplían los criterios de inclusión del ensayo clínico “Pilot Study of the Effectiveness of Probiotics and Lactitol for the Decolonization of OXA-48 (Carbapenemase) Producing *Klebsiella pneumoniae* Among Rectal Carriers (DESPROBIOXA), (NCT02307383)” que evaluaba la efectividad del lactitol y los probióticos para conseguir la descolonización intestinal de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa OXA-48 (KpOXA-48). Los sujetos del estudio eran voluntarios no hospitalizados colonizados por KpOXA-48 durante un ingreso previo (al

menos un mes previo al reclutamiento) que aceptaron participar en dicho estudio. **Cultivo y Extracción de ADN**

Las torundas rectales se sembraron directamente en agar selectivo para enterobacterias productoras de betalactamasa OXA-48 (EP-OXA) (chromID™ OXA-48, bioMérieux) y un medio líquido de triptona-soja conteniendo un disco de ertapenem (1µg/ml) incubándose durante 18 horas a 37 C°. Tras la incubación, se realizó un subcultivo del medio líquido al medio de agar selectivo y se incubó otras 18 horas a 37 C°. Las muestras de heces se procesaron de la misma manera, con la excepción de que el cultivo se realizó de una suspensión con una pequeña cantidad de las mismas (aproximadamente 0.1 g) en 0.5 ml de suero salino.

Los aislados obtenidos fueron identificados mediante espectrometría de masas con el sistema MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) y se confirmó la presencia de la carbapenemasa OXA-48 mediante qPCR (OXVIKP, Progenie Molecular®, Valencia, España).

Para la extracción del ADN de las torundas rectales se realizó una suspensión del contenido de la torunda en 1 ml de solución salina (0.9% solución de cloruro sódico, Fresenius Kabi). El procedimiento fue similar para las heces, excepto que la suspensión se realizó a partir de 0.1g de muestra aproximadamente. Esta suspensión se lisó mediante calor a 95C° durante 20 minutos, seguido de una centrifugación rápida de 1 minuto a 12.000 rpm para eliminar los residuos sólidos. El sobrenadante se extrajo con el sistema automático MagPurix® (Zinexts Life Science Corp., Taiwan).

Estudios de clonalidad de EP-OXA

Aquellos aislados que pertenecían a la misma especie pero presentaban colonias con distinta morfología se conservaron individualmente a -80C° para análisis posterior. La sensibilidad antibiótica de todos los aislados se determinó mediante paneles de MicroScan® y se interpretó de acuerdo a los criterios del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Con el fin de determinar si la cepa de KpOXA-48 aislada en el ensayo era la misma que la aislada durante la hospitalización inicial se realizó un estudio de clonalidad. Para ello, si los participantes habían estado previamente colonizados por los secuenciotipos 11 o 405 se realizó un ensayo de qPCR específica para dichos secuenciotipos. Si los participantes habían estado colonizados previamente por algún otro secuenciotipo distinto del 11 o 405, el estudio de clonalidad entre la cepa aislada durante la hospitalización y la actual se realizó mediante REP-PCR usando el sistema DiversiLab® (bioMérieux®). Para los estudios de clonalidad de las cepas de *E. coli* productoras de OXA-48 aisladas se realizó un ensayo de RAPD. En este ensayo se incluyeron las colonias de *E. coli* aisladas del mismo paciente pero que presentaban distinta morfología y/o antibiograma.

Diseño de qPCR, cebadores y sondas

Se diseñaron dos qPCRs, una dirigida al gen *bla*OXA-48, responsable de la producción de la carbapenemasa OXA-48 y otra al gen del ARNr 16S presente en todas las bacterias. Para ello se utilizaron los cebadores y sondas descritos en [55,56]. Las dos sondas utilizadas se diseñaron con el marcaje FAM.

Por cada tubo de reacción se añadió la sonda específica de la diana (0.1 µM), los cebadores *forward* y *reverse* (1 µM), 10 µl de Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc.), 2.8 µl de agua para biología molecular y 5 µl de ADN. Todas las reacciones se llevaron a cabo

en el termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) con las siguientes condiciones: Una fase de desnaturalización de 10 minutos a 95C° seguidos de 45 ciclos en dos pasos, 30 segundos de desnaturalización a 95C° y 1 minuto de elongación a 60C°.

3.5 Cuantificación de la carga intestinal de *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados

Diseño del estudio

Se trató de un estudio prospectivo observacional llevado cabo a partir de las torundas rectales enviadas desde las unidades seleccionadas a la Unidad de Epidemiología del Servicio de Microbiología del Hospital La Paz para el análisis de colonización por EPCs. Las unidades seleccionadas fueron aquellas en las que se realiza la vigilancia epidemiológica de manera sistemática (Cuidados Intensivos, Hematología, Nefrología y Oncología del Hospital General), y aquellas que se activan ocasionalmente porque se detecte transmisión activa de EPCs. Se recogieron todas las torundas identificadas como positivas para Kp_{OXA-48} durante el período de estudio por la Unidad de Epidemiología.

Se registraron los datos clínicos referentes a las siguientes variables:

- Sexo
- Edad
- Comorbilidades
- Días de hospitalización
- Tratamiento antibiótico en los 30 días previos a la recogida de la torunda
- Infección por Kp_{OXA-48} durante el episodio de hospitalización en curso

Se consideraron infectados por Kp_{OXA-48} aquellos pacientes que presentaron signos o síntomas de infección y en los que además se había aislado una Kp_{OXA-48} de una muestra clínica.

Obtención de muestras

Desde febrero del 2017 a enero del 2018 se recogieron torundas rectales con medio Amies (Deltalab, Barcelona, España) de pacientes hospitalizados dentro del protocolo de vigilancia hospitalaria para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa. Dicho protocolo contempla la recogida semanal de torundas rectales en aquellas áreas en las que se haya detectado al menos un portador de KpOXA-48.

Cultivo y extracción de ADN

Una vez recogidas, las torundas se enviaron al Servicio de microbiología del hospital y se sembraron en medios selectivos cromogénicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (mSuperCARBA™) o bien, un medio de McConkey con Cefotaxima. Las placas de agar se incubaron a 36 C° durante 18 horas. Tras la siembra, el contenido restante de las torundas se suspendió en 0.5 ml de buffer TE 1X (Tris-EDTA; 10 Mm Tris, 1Mm EDTA, pH 8.0) y se conservó a -20 C° para su análisis posterior.

La extracción de ADN se llevó a cabo usando el sistema Maxwell® 16 LEV Blood DNA kit de acuerdo a las especificaciones del fabricante excepto por la introducción de un paso intermedio. Para asegurar la lisis completa de la población bacteriana, 100 µl de la suspensión se mezclaron con 300 µl del buffer de lisis incluido en el kit y se procedió a una agitación fuerte con partículas de sílice durante 10 minutos antes de proceder con el resto del protocolo. Finalmente, el ADN se recogió en 100 µl de buffer de elución.

Diseño de qPCR, cebadores y sondas

Para este estudio se usaron los cebadores previamente descritos dirigidos al gen *blaOXA-48* y al gen del ARNr 16S, además de cebadores específicos de clon dirigidos al ST11 y ST405 [57]. En este ensayo no se usaron sondas marcadas sino el agente intercalante SYBR Green.

Cebador/Sonda	Secuencia
<i>bla</i>_{OXA-48} F	TTCGGCCACGGAGCAAATCAG
<i>bla</i>_{OXA-48} R	GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA
16S rRNA F (P891F)	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
16S rRNA R (P1033R)	TGCGGGACTTAACCCAACA
<i>K. pneumoniae</i> ST11 3F	GATCATCCGCCTATCCCTTG
<i>K. pneumoniae</i> ST11 3R	CCCAAGATGTAGGCTGCAAG
<i>K. pneumoniae</i> Sonda ST11	CCAAGCGGTAGTGATTAAGC
<i>K. pneumoniae</i> ST405 F	GGACTAACCCTATCCCTAAC
<i>K. pneumoniae</i> ST405 R	CTACATTATTTGCTGCCGTCG
<i>K. pneumoniae</i> Sonda ST405	CAACACCGCATTACAGGTC
Sonda <i>bla</i>_{OXA-48}	CTGGCTGCGCTCCGATACGTGTAAGTTATTG
Sonda 16S rRNA	CACGAGCTGACGACARCCATGCA

Cada tubo de reacción constaba de los cebadores forward y reverse (1 µM), 10 µl de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 6 µl de agua para biología molecular y 2 µl de ADN. Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) con las siguientes condiciones: Dos minutos a 50C° y dos minutos a 95C° seguidos de 45 ciclos de dos pasos, 15 segundos a 95C° y 1 minuto a 60C°.

Estudio de microbioma

Con la finalidad de observar el grado de disbiosis en cuatro pacientes con diferentes cargas relativas de *bla*_{OXA-48} se llevó a cabo un análisis de microbioma usando el ADN

obtenido a partir de las torundas rectales. Inicialmente, se realizó una amplificación de la región V4 del gen 16S rRNA usando el protocolo y cebadores descritos por Caporaso et al. (2012). Seguidamente, se realizó una librería genómica con el kit NebNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit (NewEngland) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un secuenciador Illumina Miseq® usando un kit de secuenciación V2 2x250 pair-end. Los resultados se analizaron con el software QIIME2™ [58] usando como base de datos Greengenes.

3.6 Carga relativa de *Serratia marcescens* durante un brote en unidades neonatales

Diseño del estudio

En el contexto de un brote por *S. marcescens* que afectó a la UCI neonatal y Unidad de neonatos se realizó un estudio prospectivo observacional a partir de las torundas rectales enviadas para estudio de colonización. Estas torundas se obtenían mediante cribados periódicos (aproximadamente un cribado semanal). Durante las 13 semanas que duró el brote se registró el resultado de los cultivos de todas las torundas rectales y se cuantificó la carga rectal de *S. marcescens* en 110 torundas pertenecientes a 42 pacientes. Durante las primeras 7 semanas del brote se analizaron únicamente aquellas torundas con cultivo positivo y de la semana 8 a la 13 (momento en el que se dio por finalizado el brote) se estudiaron todas las torundas.

Obtención de muestras

En el contexto de un brote hospitalario por *S. marcescens* en la UCI neonatal del Hospital Universitario La Paz que duró 13 semanas, se realizó un cribado rutinario de los neonatos mediante la recogida semanal de torundas rectales a los pacientes ingresados. Para este

estudio, se recogieron un total de 110 torundas rectales de 42 neonatos ingresados. En los casos en los que se cultivó *S. marcescens*, se guardó una suspensión del primer aislado de cada paciente.

Cultivo y Extracción de ADN

Las torundas rectales obtenidas se cultivaron en medio McConkey como parte de la rutina del Servicio para la búsqueda de neonatos ingresados colonizados por *S. marcescens*.

Se extrajo el ADN de los aislados obtenidos con el sistema NucliSENS easyMag® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN de las torundas rectales se extrajo por el mismo método utilizado en el proyecto FIS PI16-01209 (descrito anteriormente).

Diseño de qPCR y cebadores

La semicuantificación de *S. marcescens* respecto a la población bacteriana total se realizó mediante el mismo protocolo descrito en el ensayo FIS PI16-01209 con la excepción de que se utilizaron cebadores específicos de *S. marcescens* [59].

Cebadores	Secuencia
<i>S. marcescens</i> F	TGCCTGGAAAGCGGCGATG
<i>S. marcescens</i> R	CGCCAGCTCGTCGTTGTGGT

Estudio de clonalidad

Se realizó un estudio de clonalidad a partir del ADN de todos los aislados de *S. marcescens* mediante el método de RAPD.

3.7 Validación de los ensayos de qPCR

De forma general, para la caracterización de los parámetros de las distintas qPCR se utilizó el ADN extraído a partir de 1 ml de una suspensión 0.5 McFarland de cada una de las cepas diana (KpOXA-48 ST11, KpOXA-48 ST405 y *S. marcescens*). Seguidamente, se preparó una serie de diluciones 1:10 seriadas a partir del ADN para realizar una curva standard por cada pareja de cebadores que sirviera para determinar el límite de detección de la técnica, el rango de linealidad y la eficiencia de la qPCR.

Además, se calculó el efecto de la dilución del ADN en el ΔC_t para cada combinación de cebadores tanto en cepas control como en muestras clínicas. Independientemente de las dianas a cuantificar, el ΔC_t no debería modificarse con la dilución del ADN (la pendiente del $\log 2^{-\Delta C_t}$ en relación con el logaritmo de la dilución del ADN debería ser ~ 0), aunque en la práctica es aceptable cuando este valor está por debajo de 0.1 o es cercano a 0. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado para las curvas standard y por duplicado para los estudios de dilución del ADN. La eficiencia (Ef) se calculó en base a la pendiente de la curva standard ($Ef = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$).

3.8 Semicuantificación en torundas rectales

Como norma general, se realizó una dilución 1:10 del ADN extraído a partir de las muestras clínicas, torundas o heces, con el fin de evitar inhibiciones. En caso de no detección del gen diana o resultados fuera del rango de linealidad también se usó ADN sin diluir o diluido 1:100 respectivamente.

En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos para cada pareja de cebadores.

3.9 Análisis estadístico

Tanto las eficiencias como los Cts se calcularon automáticamente por el software del sistema CFX96 Touch™ software. El análisis estadístico se realizó con el software IBM® SPSS® Statistics 24.0.0.0. Para el análisis estadístico solo se consideró la primera torunda de cada paciente. En menos del 4% de los casos pacientes con cultivo positivo para KpOXA-48 el resultado de la qPCR dirigida al gen *bla*OXA-48 fue negativo. En esos casos, para fines estadísticos el $\log 2^{-\Delta\Delta C_t}$ se consideró un logaritmo por debajo del valor más bajo detectado. El valor del $\log 2^{-\Delta\Delta C_t}$ sigue una distribución no normal, y por tanto se usaron test no paramétricos como la U de Mann-Whitney. Los intervalos de confianza (95%) de las medianas se calcularon mediante el método de Bootstrap mientras que el tamaño del efecto de las variables se calculó mediante la fórmula $r = Z/(\sqrt{N})$, donde **Z** es la distancia medida en desviaciones estándar entre la media de la variable en estudio y la media poblacional y **N** es el tamaño muestral.

4. RESULTADOS

4.1 Ensayo clínico piloto DESPROBIOXA

El ensayo clínico piloto DESPROBIOXA tenía como objetivo la erradicación intestinal de EP-OXA en voluntarios extrahospitalarios colonizados por KpOXA-48 durante un ingreso anterior. Para ello se recurrió a la administración durante 3 semanas de una mezcla de probióticos y prebióticos, midiéndose los resultados semanalmente durante el tratamiento y a las 3 y 6 semanas de finalizar el mismo (**Figura 1**).

Los resultados del ensayo se midieron de dos formas:

- Mediante la detección o no de EP-OXA en cultivo de heces usando un medio selectivo.
- Midiendo la evolución de la CR_{OXA-48} en las muestras de heces mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Además, se caracterizaron las cepas aisladas durante el tratamiento y se analizó su perfil de resistencias.

Desarrollo del ensayo clínico

Se revisaron las historias de 918 pacientes que habían estado colonizados por *K. pneumoniae* OXA-48 durante el periodo 2010-2014 de los cuales veintidós cumplían los criterios de inclusión. Catorce (64%) de los veintidós pacientes presentaron cultivos negativos mientras que en ocho (36%) se pudo aislar al menos una enterobacteria productora de betalactamasa OXA-48. La mediana del número de días desde el último alta hospitalaria fue 309 (rango: 218-611) en los pacientes con cultivo negativo y 173 (rango: 33-313) en aquellos con cultivo positivo.

No se encontraron diferencias entre las variables epidemiológicas y clínicas de los dos grupos (edad, género, peso, tabaquismo, hipertensión, diabetes, dislipemia,

hiperuricemia). Los índices del estado funcional fueron similares en ambos grupos (Índice Barthel > 90, Índice Katz entre 0-1), escala de comorbilidad de Charlson's (3-5). Ninguno de los pacientes había recibido antibioterapia durante el mes previo.

No se registraron efectos adversos incluyendo problemas hepáticos, renales, hemáticos o alteraciones electrolíticas. La tolerancia al tratamiento fue buena, registrando únicamente algunos efectos adversos asociados al uso de lactitol como flatulencia en 4/8 (50%) y diarrea moderada en 1/8 (12.5%) que desapareció espontáneamente sin necesidad de suspender el tratamiento. Todos estos síntomas desaparecieron al finalizar el estudio.

Persistencia del plásmido portador de la carbapenemasa OXA-48

Dos de los pacientes portaban KpOXA-48 como única enterobacteria productora de betalactamasa OXA-48. En cuatro de los pacientes el gen *bla*OXA-48 se encontró tanto en *K. pneumoniae* como en *E. coli*, en otro paciente el gen se aisló en *Klebsiella oxytoca* y *E. coli*, y finalmente, en un paciente fue aislado únicamente en *E. coli*. Además, algunos de los pacientes portaban diferentes cepas de *E. coli* productoras de carbapenemasa OXA-48. En total se obtuvieron dieciocho cepas distintas de enterobacterias productoras de OXA-48 de los ocho pacientes, 6 *K. pneumoniae*, 11 *E. coli* y 1 *K. oxytoca*.

Mientras que las KpOXA-48 aisladas de los 8 pacientes durante su hospitalización fueron identificadas además como productoras de BLEE, tres de las seis KpOXA-48 aisladas en el estudio no producían esta enzima. Dos de estos aislados presentaron los patrones fenotípicos característicos de las cepas que expresan como única betalactamasa la carbapenemasa OXA-48 (resistencia a penicilinas, cefalotina y ertapenem) además de resistencia a otros antibióticos como tobramicina, quinolonas y fosfomicina. El tercer aislado de KpOXA-48 no productor de BLEE mostraba el patrón de resistencia asociado

a la producción de OXA-48 mientras que era susceptible a todos los demás antibióticos testados.

Respecto a las 11 aislados de *E. coli* productores de OXA-48, 6 presentaban el perfil de resistencia asociado a la producción de OXA-48 mientras que los otros 5 además presentaron resistencia a quinolonas. El aislado de *K. oxytoca* sólo presentaba las resistencias asociadas a la expresión de OXA-48.

Los estudios de clonalidad mediante qPCR de los 3 aislados de KpOXA-48 obtenidos de pacientes previamente colonizados por los ST11 o ST405 resultaron negativos, indicando que las cepas originales habían sido reemplazadas. En los 3 pacientes que habían sido colonizados por cepas no-11 no-405, los estudios de REP-PCR mostraron igualmente que los clones hospitalarios iniciales habían sido sustituidos por nuevas cepas que además eran diferentes entre sí. El ensayo de RAPD en los 11 clones de *E. coli* aislados mostró una ausencia de relación clonal entre ellos.

Efecto del tratamiento en la colonización por enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 (EP-OXA-)

Seis semanas después del finalizar el tratamiento (objetivo primario) tres voluntarios (37.5%) presentaron cultivos negativos para EP-OXA, dos de los cuales mantuvieron todos los cultivos negativos desde las últimas tres semanas del estudio (semana 5 a 9). Respecto al objetivo secundario, al finalizar el tratamiento cuatro de los voluntarios (50%) tuvieron cultivos negativos para EP-OXA y tres semanas después del tratamiento el número de voluntarios con cultivos negativos aumentó hasta seis (75%).

En resumen, seis de los voluntarios presentaron cultivos negativos de manera intermitente durante todo el estudio. Uno de los voluntarios obtuvo cultivos positivos en todas las

muestras y en otro de los voluntarios no se pudo volver aislar ninguna EP-OXA desde el inicio del tratamiento.

Validación método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para monitorizar el efecto del tratamiento en la CR_{OXA-48}

Se utilizó el ADN extraído a partir de 1 ml de una suspensión 0.5 McFarland de KpOXA-48. Seguidamente, se preparó una serie de diluciones 1:10 seriadas a partir del ADN para realizar una curva standard por cada pareja de cebadores para determinar el límite de detección, el rango de linealidad y la eficiencia de la qPCR.

De acuerdo con las curvas estándar se obtuvo un rango de linealidad de la qPCR_{16S} de 5 diluciones (8-4 log UFC/ml, $R^2=0.992$) mientras que para la qPCR_{OXA-48} fue de 7 diluciones (8-2 log UFC/ml, $R^2=0.997$). Las eficiencias de las qPCR_{16S} y qPCR_{OXA-48} fueron 0.847 y 0.850 respectivamente. El límite de detección para ambas qPCR fue de 100 UFC/ml de KpOXA-48 (**Figura 2**).

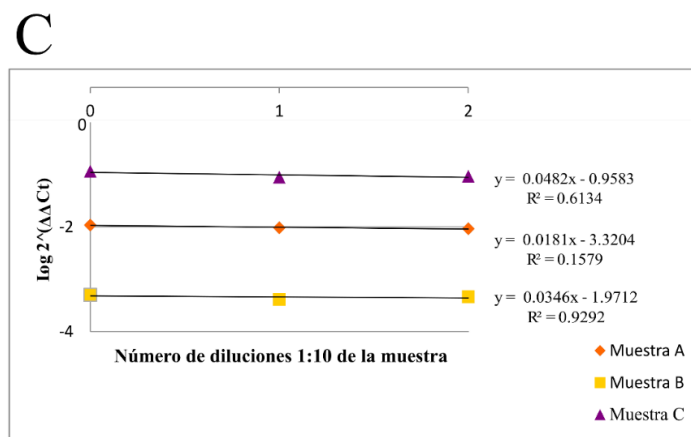
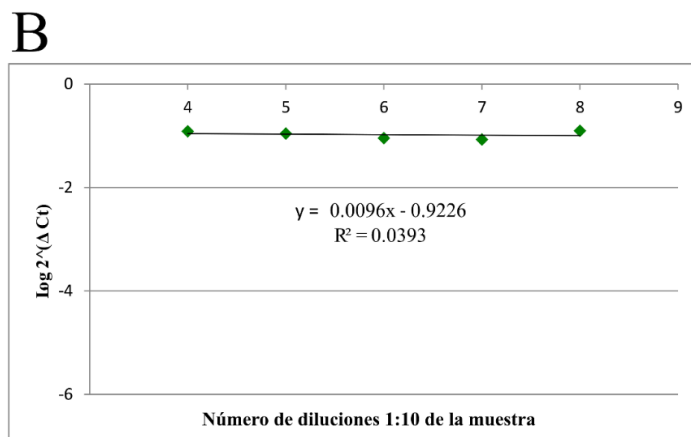
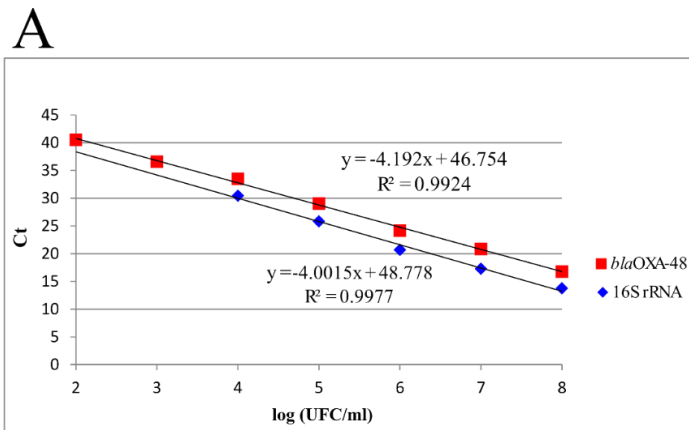


Figura 2. Ensayo de validación del método $2^{-\Delta \Delta C_t}$ mediante el uso de sondas como fluoróforo. Figura 2A: Recta de calibración a partir de la amplificación del gen $blaOXA-48$ y el gen ARNr 16S en diluciones seriadas de una suspensión 0.5 McFarland de *K. pneumoniae* OXA-48. Figura 2B. Cálculo del $\log 2^{-\Delta C_t}$ en diluciones seriadas de la suspensión de KpOXA-48. Figura 2C. Cálculo del $\log 2^{-\Delta \Delta C_t}$ en tres diluciones seriadas de torundas rectales con distinta CR_{OXA-48} .

Los efectos de la dilución del ADN en el ΔC_t se determinaron tanto en la cepa de Kp_{OXA-48} como en tres torundas rectales de pacientes colonizados. La pendiente del ΔC_t respecto a la dilución en la cepa de Kp_{OXA-48} fue de -0.0096 mientras que en las torundas rectales fue de media -0.034 (Rango: -0.0181 a -0.0482). Además, la eficiencia de la qPCR resultó independiente del tipo de muestra o la dilución.

	16SrRNA	<i>blaOXA-48</i>
Rango de linealidad (log UFC/ml)	8-4	8-2
Rango de linealidad (Ct)	13-31	16-41
Eficiencia	0.85	0.85
Límite de detección	100 UFC/ml	100 UFC/ml

Monitorización de la carga intestinal de EP-OXA durante el tratamiento

Únicamente en seis voluntarios se pudo monitorizar la CR_{OXA-48}. Los otros dos presentaron qPCR_{OXA-48} negativas en todas las muestras a pesar de presentar cultivos positivos. En los seis voluntarios con resultados de qPCR positivos, la CR_{OXA-48} al inicio del estudio fue de entre -0.33 y -3.6, lo se traduce en que en estos pacientes la población intestinal de EP-OXA supondría aproximadamente entre un 47% y un 0.025% de la población bacteriana total.

Tras dos semanas de tratamiento oral, se produjo una reducción de la CR_{OXA-48} superior a un logaritmo en todos los casos. Dos voluntarios alcanzaron niveles indetectables mientras que en los otros 3 la reducción osciló entre 1.13 y 2.55 logaritmos.

En todos los sujetos, las muestras obtenidas al final de tratamiento mostraron repuntes transitorios del CR_{OXA-48}, pero los efectos observados al finalizar el estudio no fueron homogéneos. En dos de los voluntarios el gen *blaOXA-48* fue indetectable por qPCR en

la última visita mientras que uno de los sujetos finalizó el estudio con una reducción de 3 logaritmos en el CR_{OXA-48}. Dos de los sujetos terminaron el estudio con niveles similares a los calculados en la primera muestra y finalmente uno de los voluntarios presentó un aumento significativo del CR_{OXA-48} respecto a la muestra inicial. **Figura 3.**

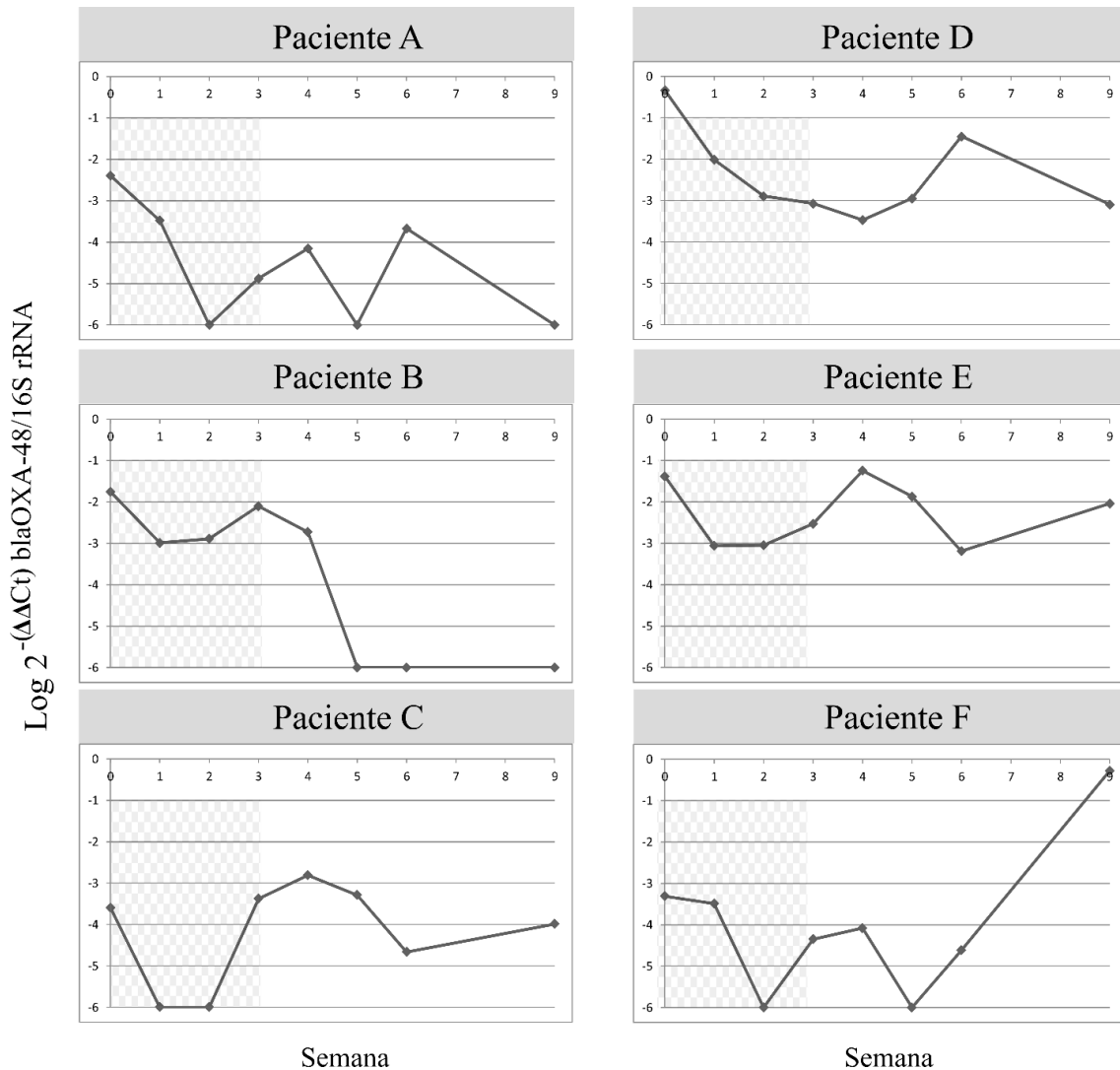


Figura 3. Evolución de la CR_{OXA-48} en los distintos pacientes durante el ensayo clínico. (Resaltado) Evolución de la CR_{OXA-48} durante del tratamiento. En todos los casos (pacientes A-F) se produjo una reducción significativa de la CR_{OXA-48} en los primeros 14 días de tratamiento, aunque esta tendió a aumentar tras finalizar el mismo (semana 3). Al

finalizar el ensayo (semana 9) la CR_{OXA-48} se mantuvo significativamente por debajo de los niveles iniciales en los pacientes A, B y D. Se recuperó hasta niveles semejantes a los iniciales en los pacientes C y E y aumentó significativamente en el paciente F.

4.2 Cuantificación de la carga intestinal de *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados

Esta parte de la tesis tenía como objetivo estudiar la variabilidad de la CR_{OXA-48} en pacientes colonizados, así como sus posibles causas y consecuencias. En paralelo, se analizó la carga rectal de las cepas de KpOXA-48 pertenecientes a los secuenciotipos ST11 y ST405 en los pacientes colonizados por dichos clones.

Desarrollo del estudio

Se recogieron 200 torundas rectales de 147 pacientes, 79 hombres (53.7%) y 68 mujeres (46.7%) con un rango de edad de 30 a 98 años (mediana: 76 años). El tiempo de hospitalización fue de 0 a 425 días siendo la mediana 18 días. 61 (41.5%) pacientes requirieron ingreso en la UCI en algún momento del episodio de hospitalización. La prevalencia de diabetes mellitus en la población estudiada fue del 23.13% y el 24.49% presentaba algún tipo de inmunodeficiencia (incluyendo aquellas debidas tanto a la condición del paciente como al tratamiento inmunosupresor).

La mayoría de los pacientes (83.4%) había recibido algún tratamiento antibiótico en los 30 días previos a la recogida de la muestra, habiendo sido tratados con carbapenémicos el 38.1% de ellos. Treinta y cinco (23.81%) de los pacientes desarrollaron alguna infección por KpOXA-48 durante la hospitalización, siendo las más frecuentes infecciones del tracto urinario (20) seguidas de las respiratorias (7), piel y partes blandas (4), infección abdominal (2) y bacteriemias primarias (2).

Validación método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

En este caso se usó como fluoróforo SYBR Green en lugar de sondas marcadas. Además, se realizaron dos qPCR adicionales cuyas dianas fueron las cepas de *K. pneumoniae* ST11 (qPCR_{ST11}) y ST405 (qPCR_{ST405}). El rango de linealidad, eficiencia y límite de detección de cada qPCR fueron similares a la anterior como se muestra en la **Figura 4**.

	16SrRNA	<i>bla</i> OXA-48	ST11	ST405
Rango de linealidad (log UFC/ml)	8-3	8-3	8-3	8-3
Rango de linealidad (Ct)	14-32*	18-35*	18-35*	17-35*
Eficiencia	0.93	0.99	0.99	0.91
Límite de detección	100 UFC/ml	100 UFC/ml	100 UFC/ml	100 UFC/ml

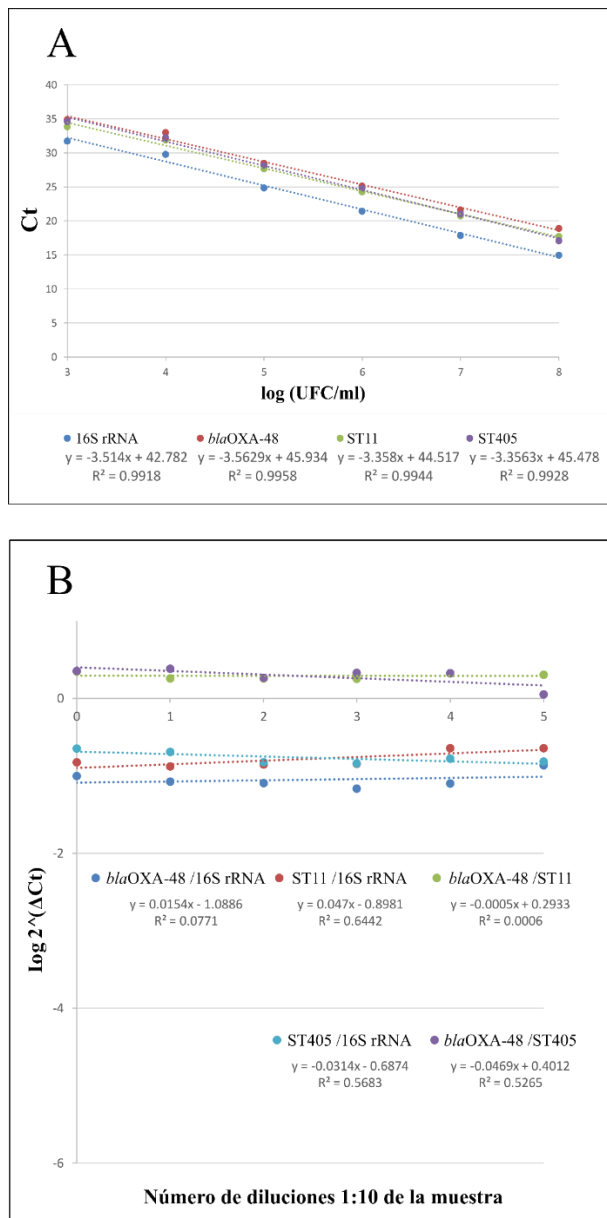


Figura 4. Ensayo de validación del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mediante el uso de SYBR Green como fluoróforo.

Figura 4A: Recta de calibración a partir de la amplificación del gen *blaOXA-48*, las dianas específicas de los secuenciotipos 11 y 405 y el gen ARNr 16S. Figura 4B. Cálculo del $\log 2^{-\Delta C_t}$ para cada combinación del gen *blaOXA-48*, las dianas específicas de los secuenciotipos 11 y 405 y el gen ARNr 16S en distintas diluciones de la suspensión de KpOXA-48.

CR_{OXA-48} en pacientes colonizados por *K. pneumoniae* OXA-48

La CR_{OXA-48} máxima calculada fue 0.68 y la mínima -3.99 (sin embargo, a efectos estadísticos asignamos un valor de -5 a las muestras con cultivo positivo y qPCR_{OXA-48} negativa), siendo la media -0.42 (**Figura 5**).

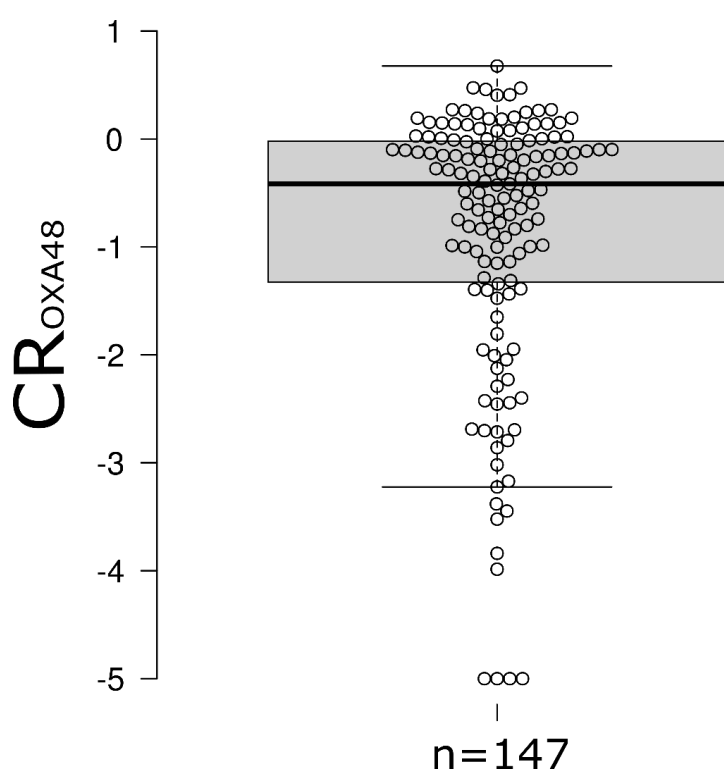


Figura 5. Gráfico de cajas y bigotes de la CR_{OXA-48} en la primera muestra obtenida de 147 pacientes. La imagen muestra los valores comprendidos entre el primer (-1.33) y el tercer (-0.02) cuartil. La línea horizontal representa la mediana (-0.41). La CR_{OXA-48} se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, expresando los resultados en escala logarítmica. Los valores superiores a cero pudieron deberse a un aumento del número de copias del gen *bla*OXA-48 o del plásmido portador del mismo.

Cabe destacar que:

- 1) El paciente con mayor CR_{OXA-48} tenía probablemente una microbiota compuesta, casi exclusivamente, por KpOXA-48.
- 2) Este paciente tenía aproximadamente una proporción intestinal de KpOXA-48 10.000 veces superior al paciente con menor CR_{OXA-48} .
- 3) Otros treinta y cuatro (23.13%) pacientes presentaron una CR_{OXA-48} superior a 0, lo cual sugiere un elevado número de pacientes con una microbiota compuesta casi exclusivamente por KpOXA-48.

La CR_{OXA-48} resultó independiente del sexo, la edad, los días de hospitalización o el ingreso en la UCI. Sin embargo, resulta interesante que los pacientes que habían sido colonizados antes del inicio del estudio (ya tenían al menos una torunda previa positiva) presentaban CR_{OXA-48} más altas (mediana $CR_{OXA-48}=0.04$; Rango=-2.28 a -0.63) que aquellos recientemente colonizados (la torunda estudiada era la primera positiva) (mediana $CR_{OXA-48}= -0.65$; Rango= -5 a -0.41) ($p<0.001$). Condiciones como inmunodeficiencias o aquellas que requerían el uso de quimioterapia o laxantes no parecieron afectar a la CR_{OXA-48} mientras que los pacientes con diabetes mellitus tienden a tener una carga menor CR_{OXA-48} que el resto ($p=0.035$).

Aquellos pacientes colonizados que habían recibido algún tratamiento antibiótico dentro del mes previo a la recogida de la torunda ($n=132$) presentaban de media una CR_{OXA-48} más alta ($p=0.029$) que aquellos pacientes que no habían sido expuestos a ningún tratamiento antibiótico en ese último mes ($n=15$). El efecto sobre la CR_{OXA-48} se observó también con regímenes terapéuticos que no contenían ningún betalactámico ($n=15$) ($p=0.005$) o aquellos en los que al menos uno de los antibióticos era un carbapenémico ($n=56$) ($p=0.009$) pero no en los tratamientos que incluyeron al menos un betalactámico no carbapenémico (61) ($p=0.267$).

El grupo de pacientes que habían desarrollado alguna infección por KpOXA-48 durante el ingreso presentaron en promedio una CR_{OXA-48} mayor que aquellos que sólo habían sido colonizados ($p=0.021$)

De todas las variables estudiadas, aquellas que presentaron un mayor tamaño del efecto fueron la presencia de torundas previas positivas ($r=0.41$), los tratamientos que incluían únicamente antibióticos no betalactámicos ($r=0.23$) y aquellos que incorporaban al menos un carbapenem ($r=0.20$).

Se encontró una asociación positiva leve pero significativa ($R=0.19$; $p=0.002$) entre el Ct de amplificación del gen ARNr 16S y la CR_{OXA-48} , indicando que aquellos pacientes con una menor población bacteriana total tendrían tendencia a dar cargas relativas más altas. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el $Ct_{16SrRNA}$ entre los pacientes que habían sido tratados con antibióticos y aquellos que no ($p=0.459$). Se recoge el resumen de los resultados en la **tabla 2**.

Tabla 2. Resumen de la relación entre la CRoxA-48 y las distintas variables analizadas

Variables		n	CRoxA-48 Mediana (IC 95%)	Tamaño del efecto r	p*
Sexo	Hombre	79	-0.47 (-0.74, -0.24)	0.02	0.488
	Mujer	68	-0.34 (-0.77, -0.16)		
Edad, mediana [rango]			76 [30 – 98]		0.638
Días Hospitalizado, median [rango]			18 [0 – 425]		0.228
Hospitalización en UCI	Si	61	-0.29 (-0.75, -0.11)	0.09	0.257
	No	86	-0.47 (-0.70, -0.28)		
Torunda previa positiva	Si	26	0.08 (-0.03, 0.19)	0.41	p<0.001
	No	121	-0.60 (-0.83, -0.36)		
Enfermedades crónicas					
Diabetes mellitus	Si	34	-0.71 (-1.06, -0.20)	0.13	0.035
	No	113	-0.32 (-0.60, -0.16)		
Inmunodeficiencia	Si	36	-0.19 (-0.91, -0.11)	0.03	0.558
	No	111	-0.48 (-0.74, -0.28)		
Tratamientos activos					
Quimioterapia	Si	15	-0.20 (-0.79, 0.00)	0.04	0.538
	No	132	-0.45 (-0.70, -0.28)		
Laxantes	Si	54	-0.40 (-0.77, -0.17)	0.04	0.335
	No	93	-0.48 (-0.75, -0.20)		

Tratamiento

antibiótico:

Cualquier antibiotico¹		132	-0.32(-0.58, -0.20)	0.18	0.020
No-betalactámicos ¹		15	-0.20 (-0.50, -0.05)	0.23	0.005
Betalactámicos no-carbapenems ¹		61	-0.64 (-1.21, -0.40)	0.01	0.291
Carbapenems ¹	Si	56	-0.20 (-0.41, -0.10)	0.20	0.009
	No	91	-0.60 (-0.91, -0.35)		
Infección por KpOXA	Si	35	-0.26 (-0.77, -0.23)	0.16	0.049
	No	112	-0.47 (-0.74, -0.28)		

¹Comparado con un grupo control de pacientes sin exposición a tratamiento antibiótico (n=16). Mediana (IC 95%): -1.07 (-2.42, -0.35)

*U de Mann-Whitney, excepto en variables continuas (edad, días hospitalizado) que fueron analizadas por un test de correlación de Pearson.

Dado que el tratamiento antibiótico puede modificar de forma significativa la población bacteriana intestinal, éste podría afectar al ciclo de amplificación de el gen ARNr 16S y por tanto artefactar los resultados de la CR_{OXA-48}. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la media del Ct del gen ARNr 16S entre los pacientes tratados con antibióticos y los que no ($p=0.715$). (**Figura 6**)

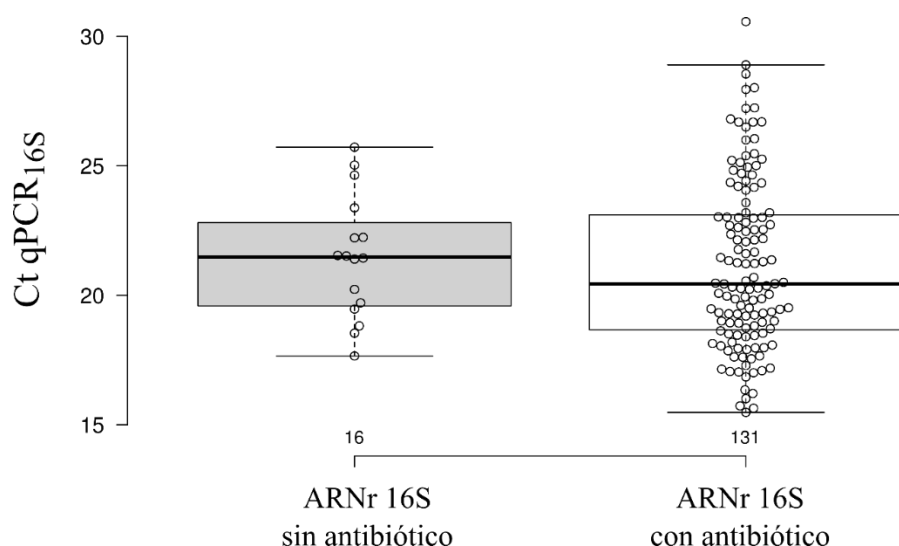


Figura 6. Ciclos de amplificación del gen ARNr 16S en los pacientes tratados o no tratados con antibióticos. En el caso de los pacientes tratados con antibiótico el primer y tercer cuartil fue de 17.66 y 22.81 con una mediana de 21.48 mientras que en el caso de los no expuestos a antibióticos el rango intercuartílico fue de 15.64 a 23.11 con una mediana de 19.34.

Carga relativa de cepas ST11 y ST405 productoras de *bla*OXA-48

Entre los 147 pacientes estudiados, 51 (34.7%) estaban colonizados por *K. pneumoniae* ST11, 14 (9.5%) por el ST405 y 82 (55.8%) por otros secuenciotipos. No se encontraron diferencias significativas en la CR_{OXA-48} entre los pacientes colonizados por secuenciotipos epidémicos (ST11 y ST405) y no epidémicos ($p=0.055$) ni entre el ST11 y el ST405 ($p=0.483$). Sin embargo, los pacientes colonizados por *KpOXA-48* ST11 presentaban una CR_{OXA-48} significativamente mayor que aquellos colonizados por secuenciotipos no-11 no-405 ($p=0.041$).

Al cuantificar la carga relativa de los clones epidémicos (CR_{ST11} y CR_{ST405}) en pacientes colonizados por dichas cepas, tampoco encontramos diferencias significativas entre ellos

en cuanto al grado de colonización ($p=0.466$). Sin embargo, los secuenciotipos 11 y 405 podrían responder de manera distinta a la exposición al tratamiento con carbapenémicos. (el número de pacientes colonizados por ST11/ST405 sin tratamiento antibiótico resultó insuficiente para valorar el efecto de los antibióticos en general sobre estos secuenciotipos). En este sentido, mientras que en los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* ST11, la CR_{ST11} suele ser elevada independientemente de la exposición o no a carbapenémicos ($p=0.424$), en los pacientes colonizados por el secuenciotipo ST405, el tratamiento con carbapenémicos aumentó significativamente la CR_{ST405} ($p=0.008$). Aunque en menor medida, este efecto también se observa en la CR_{OXA-48} de los pacientes colonizados por los secuenciotipos 11 y 405. En ellos, la exposición a carbapenémicos parece tener un efecto inductor ligeramente menor del aumento de la CR_{OXA-48} en los pacientes colonizados por el ST11 ($p=0.054$) que en los colonizados por el ST405 ($p=0.045$).

Como es esperable, en los pacientes colonizados por KpOXA-48 ST11 o ST405 existe una correlación positiva entre la CR_{OXA-48} y la de la cepa colonizante ($r(64)= 0.41$, $p<0.001$) aunque algunos pacientes presentan desviaciones importantes. Algunos pacientes presentan CR_{OXA-48} más altas de lo esperado para la abundancia relativa de las cepas ST11 o ST405 (**Figura 6**) mientras en otros la $CR_{ST11/405}$ supera en más de un logaritmo a la CR_{OXA-48} .

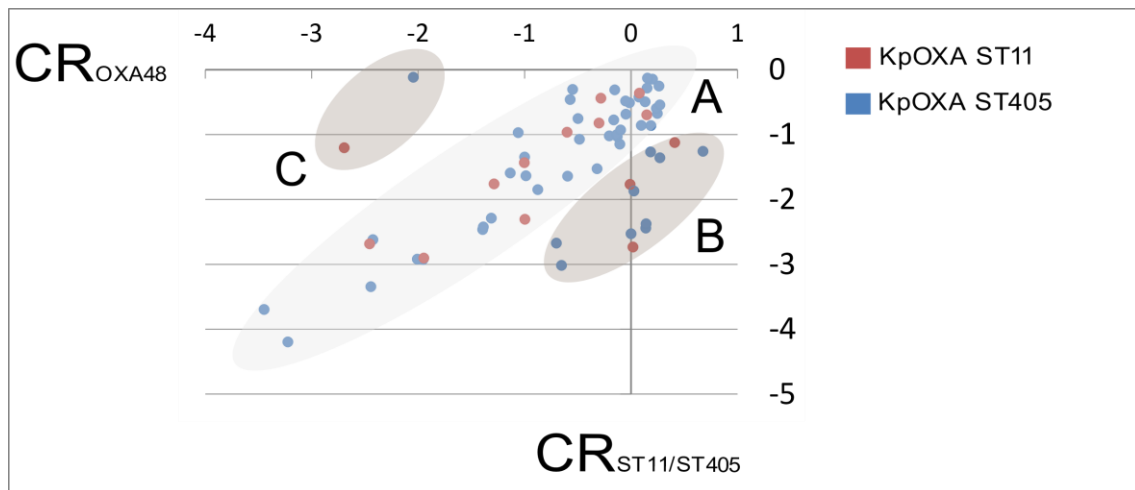


Figura 7. Relación entre la CR_{OXA-48} y la $CR_{ST11/ST405}$ en pacientes colonizados por las cepas epidémicas. En la mayoría de los pacientes (grupo A) la carga relativa del gen *blaOXA-48* y la del secuenciotipo colonizador presentan una correlación lineal. Sin embargo, en algunos pacientes la CR_{OXA-48} y la $CR_{ST11/405}$ puede diferir hasta en varios órdenes de magnitud. Siendo mayor la CR_{OXA-48} que la $CR_{ST11/405}$ en el grupo B y viceversa en el C.

Seguimiento de la CR_{OXA-48} en pacientes con múltiples muestras

En 36 pacientes que tuvieron una hospitalización prolongada o varios ingresos se pudieron recuperar al menos dos muestras rectales consecutivas para analizar las variaciones de la CR_{OXA-48} en el tiempo. El tiempo entre las distintas muestras fue de entre 0 a 244 días. Independientemente del tiempo entre muestras, la mayoría de los pacientes (n=29) mantuvo una CR_{OXA-48} estable, con variaciones entre la primera y las siguientes muestras menores a 1 logaritmo. Sin embargo, en otros pacientes (**Figura 8A-8D**) sí se observaron incrementos (n=3) o disminuciones (n=4) de la CR_{OXA-48} (variación entre la primera y las siguientes muestras mayor a 1 logaritmo).

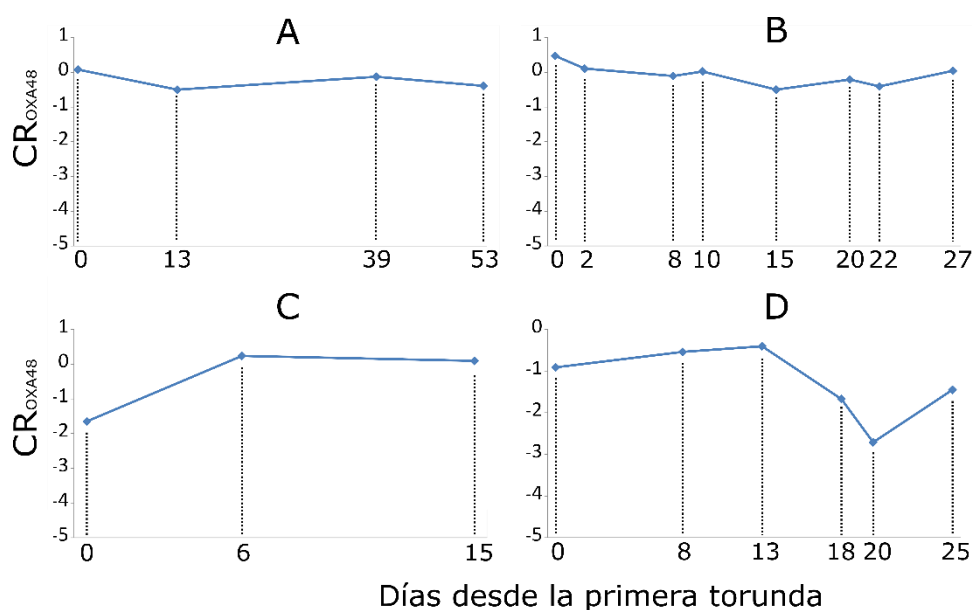


Figura 8. Evolución de la CR_{OXA-48} en cuatro pacientes. Figura 8A y 8B: Pacientes con CR_{OXA-48} elevada y sostenida a lo largo del tiempo; Figura 8C: Paciente con aumento de la CR_{OXA-48} a los 6 días del ingreso; Figura 8D: Paciente con disminución de la CR_{OXA-48} entre la segunda y tercera semana de ingreso y posterior aumento.

Además, en algunos pacientes colonizados por *K. pneumoniae* ST11 se pudieron analizar varias torundas rectales recogidas en diferentes momentos durante el ingreso hospitalario. Esto nos ha permitido observar que la carga relativa de la cepa epidémica (CR_{ST11}) y del plásmido portador del gen *blaOXA-48* (CR_{OXA-48}) pueden evolucionar de forma independiente en el tiempo. En la mayoría de los casos ambos valores se mantienen estables, mientras que el aumento o disminución de la CR_{ST11} suele llevar asociado un aumento o disminución semejante de la CR_{OXA-48} (**Figura 9A-9B**). Sin embargo, esto no siempre se cumple (**Figura 9C-9D**). En uno de los pacientes se observa una disminución a los pocos días de la carga relativa del clon ST11 mientras la carga relativa del gen *blaOXA-48* parece aumentar. En otro paciente, tras pasar 121 días desde la primera muestra, la CR_{ST11} aumenta significativamente mientras la CR_{OXA-48} se mantuvo estable.

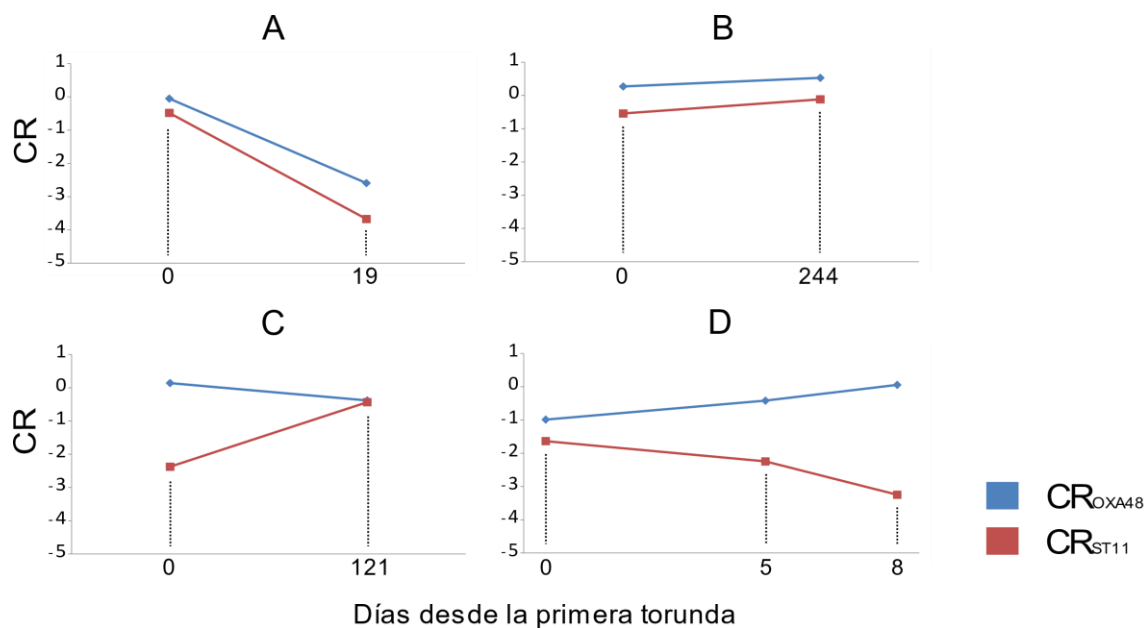


Figura 9. Evolución de la CR_{OXA-48} y CR_{ST11} en pacientes colonizados por el KpOXA-48 ST11. Figura 9A: Reducción simultánea de la CR_{ST11} y CR_{OXA-48}; Figura 9B: Paciente con una CR_{ST11} y CR_{OXA-48} elevadas y estables durante un largo periodo de tiempo; Figura 9C: Paciente colonizado durante largo tiempo con aumento de la CR_{ST11} intestinal sin modificación de la CR_{OXA-48}; Figura 9D: Paciente con disminución rápida de la CR_{ST11} con aumento de la CR_{OXA-48}.

Análisis del microbioma intestinal

Se seleccionaron cuatro pacientes que representaban un amplio rango de valores de CR_{OXA-48} y se hizo un estudio de microbioma intestinal utilizando el mismo material genético extraído de las torundas para el análisis por qPCR.

La CR_{OXA-48} en las torundas de los pacientes seleccionados fue de 0.7, 0, -1.0 y -4.0. Como se observa en la **Figura 10**, el análisis de microbioma muestra como a mayor CR_{OXA-48}, los pacientes presentaron una menor complejidad en el microbioma. En los casos extremos, el paciente con mayor CR_{OXA-48} tenía un microbioma dominado casi

exclusivamente por *Enterobacteriaceae*, mientras que en el de menor CR_{OXA-48} las enterobacterias constituían una fracción menor.

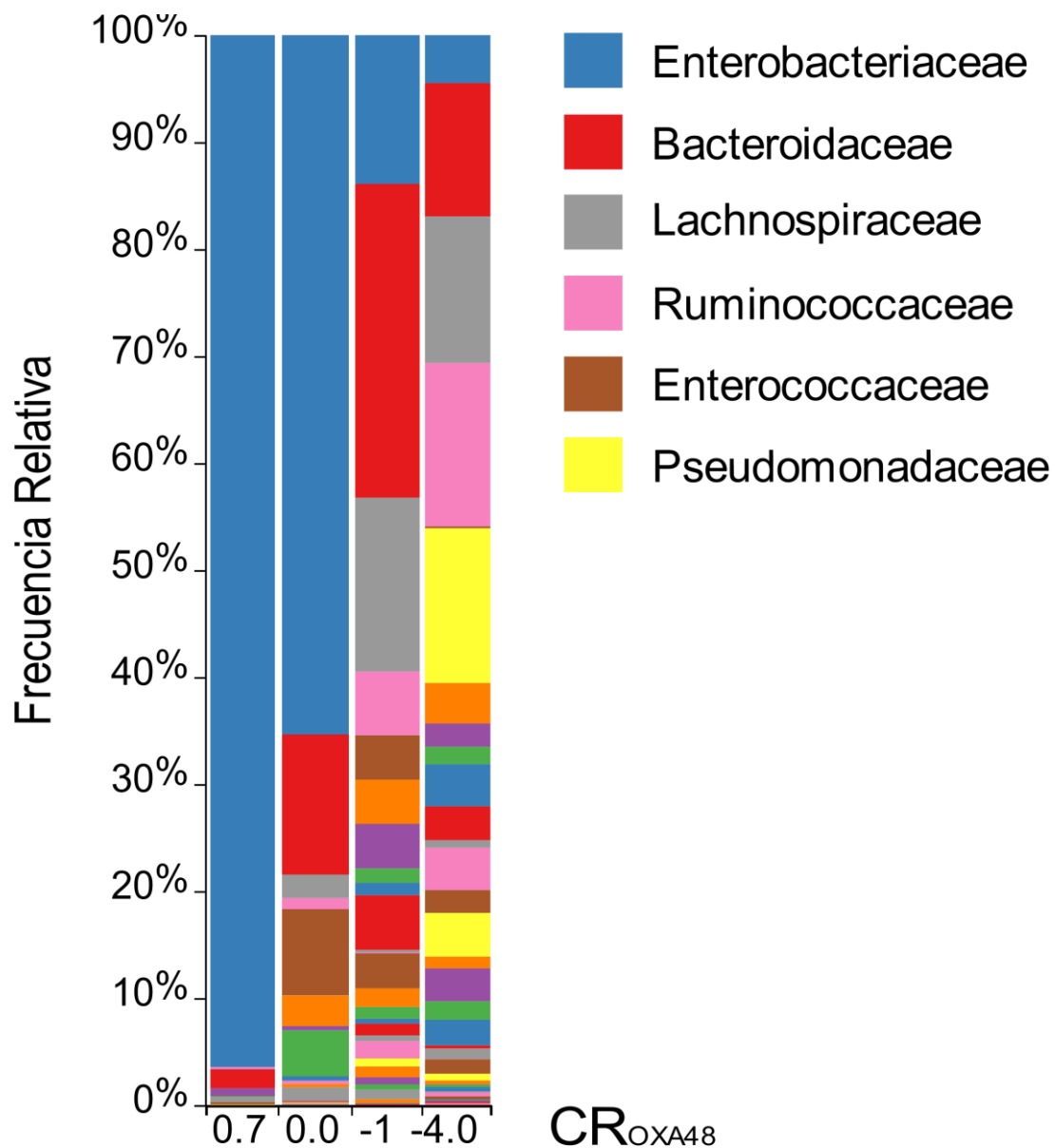


Figura 10. Análisis del microbioma de cuatro pacientes con distintas CR_{OXA-48}. Los pacientes con mayor CR_{OXA-48} presentan un microbioma con mayor proporción de la familia Enterobacteriaceae y una menor diversidad. La diversidad alfa (Índice de Shannon) de los pacientes con CR_{OXA-48} de 0.7, 0, -1 y -4 fue de 2.8, 3.9, 6.2 y 6.4 respectivamente.

4.3 Carga relativa de *Serratia marcescens* durante un brote en unidades neonatales

El objetivo de esta parte de la tesis fue valorar la aplicabilidad del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para un microorganismo y contexto distinto al anterior. Para ello, se realizó un seguimiento de la carga intestinal de *S. marcescens* durante un brote en una unidad neonatal con la finalidad de determinar los rangos y evolución de CR_{Sm} para plantear futuros estudios.

Desarrollo del estudio

El brote por *S. marcescens* se consideró activo durante 13 semanas afectando a 13 pacientes. Durante las primeras 8 semanas, 7 pacientes fueron colonizados por el mismo clon (**clon 1**) y tres por clones esporádicos. De la semana 8 a la 13 sólo se registraron 3 nuevos casos, los tres colonizados por un mismo clon distinto a los anteriores (**clon 2**).

Los cultivos rectales de *S. marcescens* fueron positivos en 38 (71.15%) de las 53 torundas obtenidas de los 13 neonatos afectados por el brote. En este grupo todas las qPCR específicas resultaron positivas excepto una (en la cual el cultivo también fue negativo). Por otro lado, la qPCR también resultó positiva en 12 de las 31 torundas (32.76%) de los neonatos estudiados considerados no afectados por el brote (recogidas entre la semana 8 y 13).

Validación del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Se realizaron dos qPCRs, una específica de *S. marcescens* y otra dirigida al gen del ARNr 16S usando como fluoróforo SYBR Green.

Para calcular el rango de linealidad, eficiencia y límite de detección de cada qPCR se realizó una nueva recta de regresión. Igual que en los casos anteriores se realizó un estudio de independencia de la CR_{Sm} de la dilución del ADN. La pendiente del ΔC_t respecto a la dilución en la cepa de *S. marcescens* fue de 0.028 para las 4 primeras diluciones (**Figura 11**).

<i>S. marcescens</i>	
Rango de linealidad (log UFC/ml)	8-3
Rango de linealidad (Ct)	20-37
Eficiencia	0.93
Límite de detección	100 UFC/ml

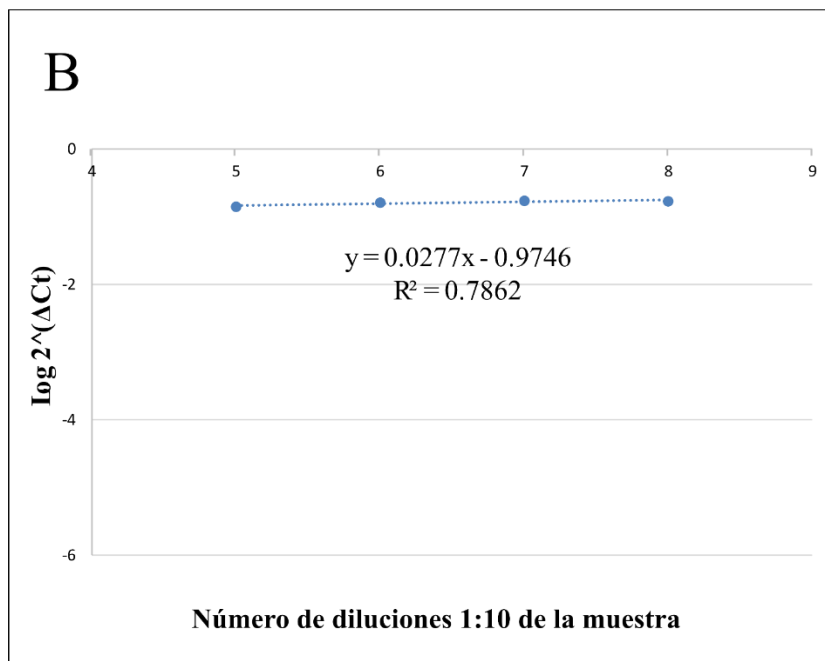
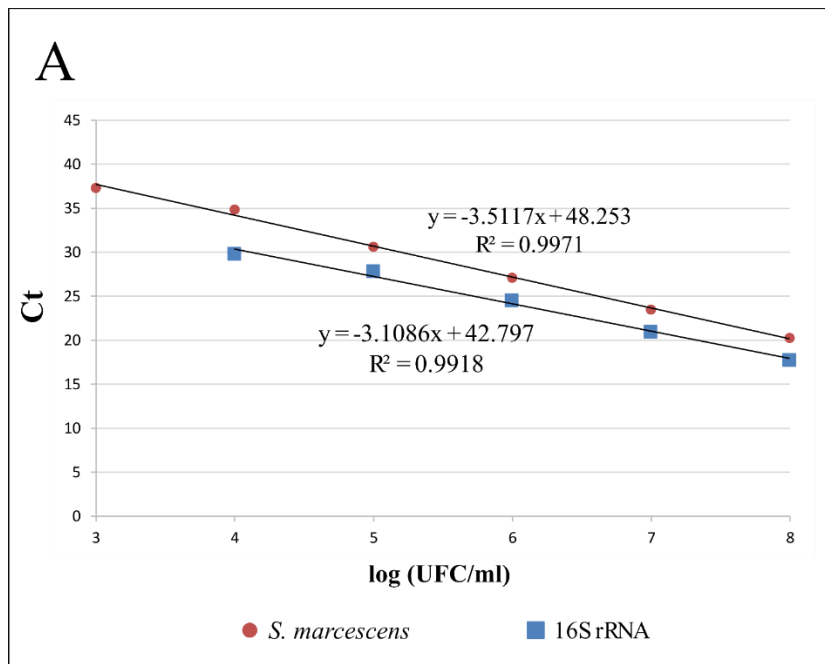


Figura 11. Ensayo de validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cuantificación de la CR de *S. marcescens* en neonatos colonizados. Para la validación de este ensayo se utilizaron diluciones seriadas de una suspensión 0.5 McFarland de una cepa de *S. marcescens*. Figura 11A: Recta de calibración a partir de la amplificación de la diana específica de *S. marcescens* y el gen ARNr 16S. Figura 11B. Cálculo del $\log 2^{-\Delta Ct}$ para cada dilución de la suspensión de *S. marcescens* dentro del rango de linealidad.

Los pacientes afectados por el brote presentaron una CR_{Sm} mediana de -0.92 (-0.17, -2.70) y de -3.07 (-0.39, -5.11) el resto de pacientes, considerándose la diferencia entre ambas estadísticamente significativa ($p<0.001$). Esta diferencia también resultó significativa ($p<0.001$) al considerar únicamente la primera torunda positiva de cada paciente, siendo la CR_{Sm} mediana de los pacientes afectados por el brote de -0.38 (-0.17, -1.78) y de -3.03 (-0.39, -4.83) en el resto.

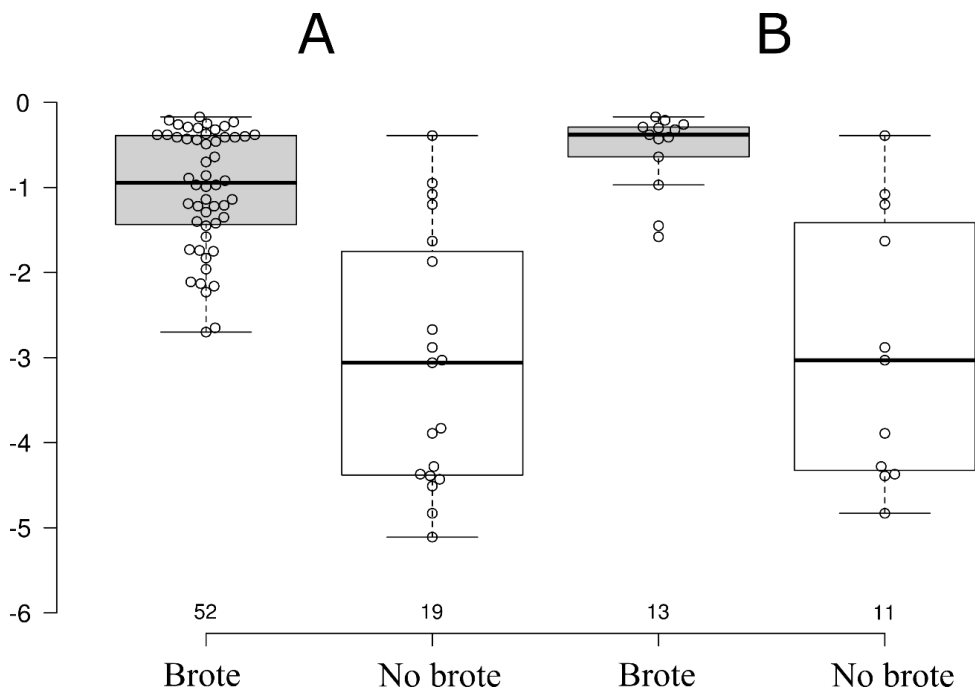


Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes de la CR_{Sm} en pacientes considerados afectados por el brote y el resto. Figura 12A. Diferencias en la CR_{Sm} al considerar todas las torundas. Los pacientes afectados por el brote presentaron un rango entre el primer y tercer cuartil de -1.44 a -0.39 y una mediana de -0.95 mientras que el rango intercuartílico para los no afectados fue de -4.38 a -1.75 con una mediana de -3.06. Figura 12B. Diferencias en la CR_{Sm} al considerar únicamente la primera torunda de cada paciente. En este caso los pacientes pertenecientes al brote presentaron un rango intercuartílico Q1-Q3 de -0.64 a -0.19 con una mediana de -0.38 mientras que los no afectos presentaron un rango de -4.33 a -1.42 y una mediana de -3.03.

Finalmente, se pudo realizar un seguimiento de la CR_{Sm} en 12 pacientes afectados por el brote y 5 de los considerados no afectados (**Figura 13**), encontrando que en la mayoría de neonatos considerados afectados por el brote, la CR_{Sm} tendía a disminuir con el tiempo. Así, por cada paciente, las últimas torundas recogidas tenían una CR_{Sm} significativamente menor a las primeras ($p=0.041$). En el caso de los no afectados el número de pacientes fue insuficiente para realizar un análisis estadístico, si bien sólo se produjo una reducción en la CR_{Sm} en dos de los cinco pacientes.

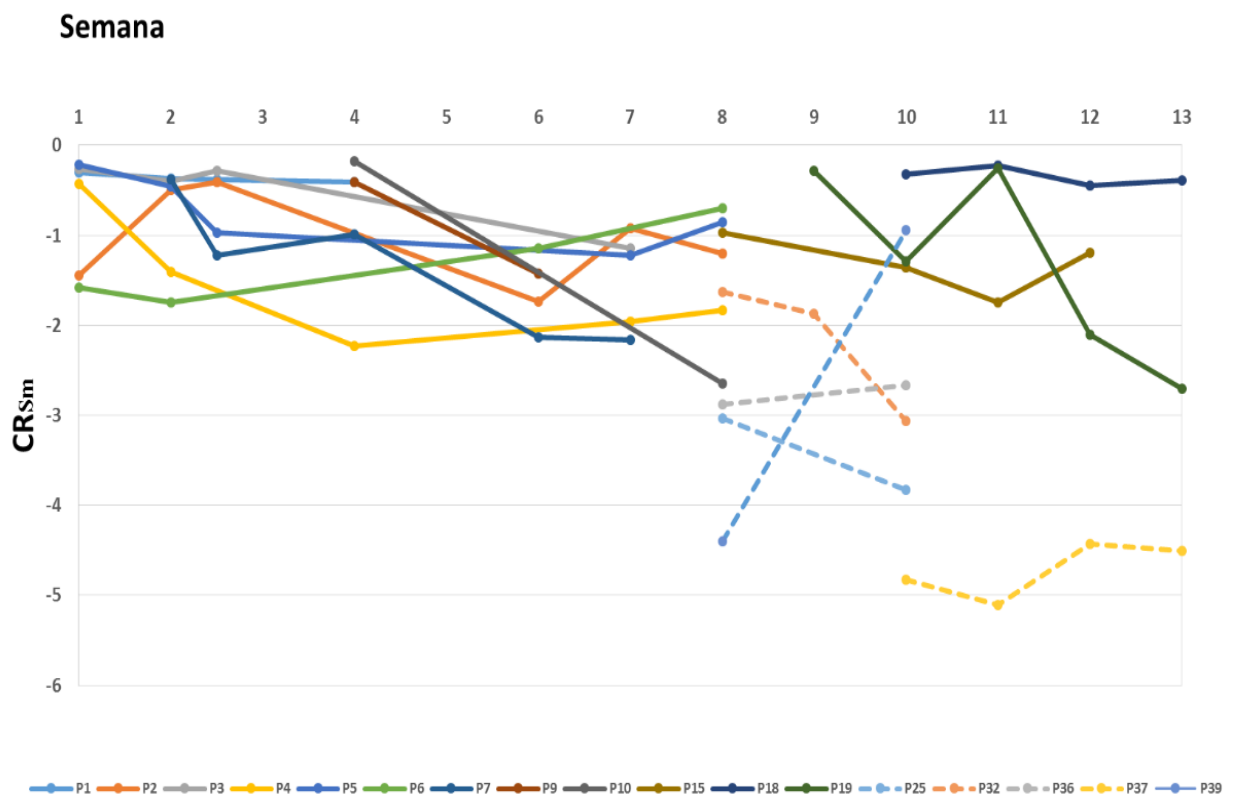


Figura 13. Evolución de la CR_{Sm} en el tiempo. (Línea continua) pacientes afectados por el brote de *S. marcescens*. (Línea discontinua) pacientes considerados no afectados.

5. DISCUSIÓN

5. 1 Ensayo clínico piloto DESPROBIOXA

En este estudio se probó la eficacia de tres semanas de tratamiento oral con una combinación de lactitol y probióticos (*Lactobacillus* sp. plus *Bifidobacterium* sp.) para la descolonización intestinal en ocho portadores crónicos de EP-OXA. La seguridad y tolerancia del tratamiento fueron buenos en todos los pacientes. El objetivo primario (cultivos negativos 6 semanas después de terminar el tratamiento) se alcanzó únicamente en tres de los ocho pacientes. En los seis pacientes en los que se pudo cuantificar la carga intestinal se evidenció una rápida reducción de la carga intestinal de EP-OXA durante el tratamiento, aunque esta volvió a aumentar tras finalizar el mismo. No obstante, al terminar el estudio cinco de los seis pacientes seguían teniendo una menor carga de EP-OXA que en el momento inicial.

Se ha demostrado que con el tiempo los pacientes colonizados por EPCs se descolonizan espontáneamente [60] y, de hecho, 14 de los 22 candidatos que cumplían los criterios de inclusión resultaron negativos. Estos pacientes llevaban más tiempo fuera del entorno hospitalario que los 8 pacientes con PCR positiva, lo que sugiere que en estos pacientes también se podría haber producido un aclaramiento espontáneo.

Con la selección de portadores crónicos se pretendía reducir la posibilidad de una descolonización espontánea durante el tratamiento. Por tanto, la drástica reducción de la carga intestinal de EP-OXA en las dos semanas siguientes al tratamiento sugiere que se debe a un efecto de este. Nuestros resultados resultan especialmente interesantes debido a que cargas elevadas de EPCs se han relacionado con aumento de la contaminación del entorno del paciente [40] y, por tanto, un mayor riesgo de diseminación a otras unidades y pacientes.

Un hallazgo casual del estudio fue que en todos los pacientes las cepas adquiridas en el hospital se habían aclarado espontáneamente. Sin embargo, el plásmido portador de la OXA-48 se había mantenido gracias a su transmisión a otras cepas endógenas (multirresistentes o no) de *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* o *Escherichia coli*. Esto resultó especialmente interesante dado que en todos los casos, el mantenimiento sostenido del plásmido se había producido en ausencia de presión antibiótica.

A pesar del reducido grupo muestral podemos pensar que estos eventos de transmisión del plásmido a otras poblaciones bacterianas debe ser bastante frecuente y por tanto un problema epidemiológico. La microbiota intestinal de estos pacientes podría ser un reservorio sostenido del gen *bla*OXA-48 en la comunidad, permitiendo su transmisión a contactos cercanos, incrementando la prevalencia de infecciones comunitarias por enterobacterias productoras de carbapenemasas y facilitando la transmisión entre pacientes ante nuevos ingresos hospitalarios. En este sentido, en otro estudio habíamos comprobado que hasta un 10% de los pacientes con infecciones por EPCs adquiridas en la comunidad no tenían relación aparente con el sistema sanitario [9] pero al menos dos de ellos convivían con personas con colonizaciones por EPCs previas.

Las principales limitaciones del estudio están relacionadas con el pequeño número de pacientes, que además no son representativos de la población general de portadores de EP-OXA, y con la ausencia de un grupo control para medir la descolonización espontánea. Esto se debió principalmente al elevado número de criterios de exclusión fijados al inicio del estudio cuya intención fue la de evitar interferencias relacionadas con los tratamientos en curso o morbilidades y que tuvo como consecuencia un tamaño muestral menor al esperado. Otra de las limitaciones del diseño del estudio resultó de la incapacidad de conocer el efecto sobre la carga intestinal que habrían podido tener probióticos y prebióticos por separado. A pesar de eso, nuestros resultados sugieren que

el tratamiento utilizado tiene un efecto rápido y sostenido (mientras dura el tratamiento) sobre la carga intestinal de EP-OXA y que esta estrategia podría ser probada en grupos seleccionados de pacientes hospitalizados. La reducción de EP-OXA por debajo del límite de detección podría reducir el riesgo de desarrollar una infección y reducir las tasas de transmisión cruzada en unidades con pacientes colonizados. Por tanto, podría ser interesante en determinadas situaciones como cirugías programadas de pacientes colonizados o en unidades con pacientes críticos.

En el momento actual sigue sin haber evidencia de la utilidad del uso de los probióticos para la descolonización intestinal por bacterias multirresistentes. En este sentido resulta difícil comparar nuestros resultados con los de otros estudios debido a que, en la mayoría de los casos, estos se llevaron a cabo mediante la administración únicamente de probióticos [30-3334]. Además, estos estudios tenían como objetivo primario la descolonización al finalizar el tratamiento, no midiéndose el efecto a largo plazo ni sobre la carga intestinal.

Finalmente, hay que tener en cuenta que las cepas sobre las que se intentó la erradicación no fueron las cepas hospitalarias que habían colonizado al paciente inicialmente, y por tanto sería interesante reproducir el ensayo sobre pacientes dados de alta recientemente o en pacientes hospitalizados.

5.2 Cuantificación de la carga intestinal de *K. pneumoniae* OXA-48 en pacientes ingresados

La colonización intestinal de los pacientes colonizados por EPCs es una de las rutas más importantes para la dispersión de las carbapenemasas. Dada la gran cantidad de bacterias intestinales, el rango potencial del tamaño de la población para cualquier clon o especie se mueve en varios órdenes de magnitud, y las variaciones en la carga intestinal podrían

tener un alto impacto en el riesgo de infección en los pacientes colonizados, la transmisión a otros pacientes y la contaminación del entorno.

Los estudios hospitalarios de vigilancia epidemiológica de EPCs se realizan normalmente a partir de torundas rectales, que resultan más adecuadas para monitorización que las muestras de heces. A pesar de que los resultados se informan siempre de forma cualitativa (positiva/negativa) resulta posible realizar una cuantificación relativa de los genes que codifican las carbapenemasas mediante el uso del gen del ARNr 16S como elemento normalizador de la medida sobre el total de la población bacteriana.

En esta parte del trabajo hemos utilizado esta aproximación para determinar de manera indirecta la carga intestinal de KpOXA-48 midiendo la del gen *bla*_{OXA-48} y de manera directa la de los dos clones epidémicos de KpOXA-48 en pacientes ingresados. A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que las cargas relativas tanto del propio gen *bla*_{OXA-48} como de los clones portadores del mismo presentan un rango muy amplio. Sorprendentemente, muchos de los pacientes estudiados presentaban cargas relativas muy elevadas, con resultados similares a los que presenta un cultivo puro de KpOXA-48. En estos pacientes, el microbioma se encontraría fuertemente alterado, estando compuesto casi exclusivamente por uno de los clones de KpOXA-48 y por tanto serían, con diferencia, el mayor reservorio de KpOXA-48 dentro del hospital. La capacidad de estas cepas de convertirse en la especie dominante del microbioma intestinal explicaría su capacidad para contaminar el entorno del paciente, su transmisión a través de manos y fómites y la dificultad del control de brotes dentro del hospital a pesar de los esfuerzos realizados.

En este trabajo hemos encontrado una asociación significativa positiva entre la CR_{OXA-48} y el uso de carbapenémicos y otros antibióticos no β -lactámicos, lo que sugiere que la

selección antibiótica estaría jugando un papel clave en el aumento de la carga intestinal. Curiosamente, no se encontró asociación significativa con otras variables como la administración simultánea de más de un antibiótico, tratamientos superiores a 3 días o el tratamiento con β -lactámicos no carbapenémicos. En este último caso, pudo ser debido a su uso con fines profilácticos o al reducido espectro de algunos betalactámicos.

Una asociación significativa no esperada fue la menor CR_{OXA-48} en pacientes diabéticos. En este sentido, algunos estudios parecen indicar que la metformina podría tener algún efecto sobre el microbioma [61], especialmente favoreciendo el crecimiento de *E. coli* mientras que por otro lado un trabajo reciente apunta a una posible relación entre la diabetes mellitus y el riesgo de sepsis por *K. pneumoniae* resistente a los carbapenems en pacientes críticos [62]. Por tanto, se necesitarían nuevos estudios para clarificar la relación entre estas dos variables.

Cuando se estudió la carga relativa de los dos clones principales encontramos diferencias importantes entre ellos. Mientras que la carga del clon ST405 pareció aumentar significativamente con el tratamiento antibiótico, ese efecto no se observó en el ST11. Una posible explicación podría ser el hecho de que el clon ST405 se expandió inicialmente en el ámbito hospitalario debido a su asociación con el plásmido portador del gen *bla*_{OXA-48}. Dicho clon podría estar menos adaptado al entorno hospitalario y por tanto su expansión en forma de brotes depender de la presión antibiótica. Al contrario, el clon ST11 ya tenía una distribución mundial a nivel hospitalario antes de la aparición de las carbapenemasas, normalmente asociado a betalactamasas de espectro extendido, por lo que es posible que estuviera mejor adaptado al medio hospitalario y su capacidad para colonizar el tracto intestinal dependa menos de la presión antibiótica.

De confirmarse estos datos, podría suponer que las medidas de control de brotes basadas en los programas de optimización del uso de antibióticos podrían tener más efecto sobre algunos clones, como el ST405, que en otros, como el ST11. Por tanto, esta podría ser una de las razones del progresivo desplazamiento del ST405 por el ST11 observado en nuestro hospital. Esta hipótesis requeriría un estudio más detallado comparando las características de los clones epidémicos, fuertemente adaptados al medio hospitalario, frente a los esporádicos. Además, resulta interesante que a pesar de la prevalencia en nuestro hospital de ambos clones no se detectara ningún paciente colonizado por ambos clones a la vez.

Los pacientes que desarrollaron alguna infección por KpOXA-48 en un periodo de hasta dos meses alrededor de la toma de muestra tenían cargas relativas de KpOXA-48 más altas que aquellos que no llegaron a desarrollar infección, lo que sugiere una relación directa entre la carga intestinal y el riesgo de infección. Aunque el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la infección pueda parecer alto, la mayoría de pacientes en los que se pudieron obtener muestras seriadas mantuvieron cargas intestinales estables de KpOXA-48 a lo largo del tiempo. Finalmente, como era esperable la carga intestinal de los clones ST11 o ST405 y la del gen *bla*_{OXA-48} correlacionan fuertemente, aunque en algunos casos pueden divergir significativamente. Esto podría darse en eventos de transferencia de plásmido a otras cepas endógenas ($CR_{OXA-48} \gg CR_{ST11/405}$) o en pacientes colonizados por dos cepas del mismo clon epidémico en la que una de ellas hubiera perdido el plásmido portador del gen *bla*_{OXA-48} ($CR_{ST11/405} \gg CR_{OXA-48}$). Averiguar la causa real de estas divergencias requeriría la realización de cultivos en medios selectivos y posterior análisis de las colonias. Sin embargo, en nuestro medio observamos con relativa frecuencia las dos situaciones: pacientes que portan de manera simultánea cepas de *K. pneumoniae* BLEE productoras y no productoras de la

carbapenemasa OXA-48 y otros que portan más de una enterobacteria productora de OXA-48. Ambas situaciones podrían justificar los resultados obtenidos.

5.3 Carga relativa de *Serratia marcescens* durante un brote en unidades neonatales

Los brotes por *S. marcescens* son un importante problema en las unidades neonatales y pediátricas. Su explosividad y la alta incidencia de infecciones suponen un elevado riesgo para los pacientes y por tanto, el control del brote requiere una respuesta inmediata. Al ser *S. marcescens* un microorganismo ubicuo y la mayoría de los brotes provocados por una o varias cepas salvajes, se plantea la incógnita de qué factores desencadenan su aparición. Además, es frecuente que cuando se producen nuevos brotes estos no guarden relación filogenética con los anteriores.

De acuerdo con los resultados mostrados, podemos decir que hasta un 35% de los pacientes considerados no afectados por el brote sí estaban colonizados por *S. marcescens*, pero la CR_{Sm} era significativamente menor a la de aquellos que habían tenido un cultivo positivo. Además, sólo estos últimos desarrollaron infecciones. Aunque queda fuera del alcance de este trabajo, un estudio previo de microbioma neonatal [63] sugiere que el riesgo de infección por *S. marcescens* podría estar relacionado con altas CR_{Sm}. En dicho estudio los investigadores realizaron un seguimiento del microbioma de neonatos ingresados mediante la secuenciación masiva del gen ARNr 16S, observando que en algunos pacientes la proporción de *S. marcescens* aumentaba poco antes de desarrollar una sepsis por dicho microorganismo. En este caso, el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sería de utilidad para confirmarlo.

A pesar de ser un estudio preliminar podríamos especular que, al igual que en el caso de las EPCs, la explosividad de los brotes por *S. marcescens* podría estar relacionada con factores que favorezcan una colonización inicial muy intensa (externos, la propia cepa o

ambos). Además, en el caso de los neonatos, esta colonización se vería favorecida por un microbioma intestinal inmaduro en el cual un pequeño inóculo podría dar lugar a un efecto fundador e inclinar la balanza hacia la dominancia intestinal de *S. marcescens*.

De esta forma, los primeros neonatos colonizados intensamente actuarían como superdiseminadores afectando al resto de pacientes susceptibles de ser colonizados.

En este sentido, llevar a cabo una monitorización activa de la CR_{Sm} en tiempo real ayudaría a determinar estos factores y a detectar posibles superdiseminadores antes de que se produzca la aparición de un brote.

5.4 Discusión general

El método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es complementario al basado en la secuenciación masiva del gen del ARNr 16S. Este último tiene por objetivo ofrecer una visión general del microbioma, lo que permite analizar los cambios que afectan a la población bacteriana en su conjunto. A pesar de su amplia aceptación presenta varios inconvenientes, especialmente la falta de estandarización del método, la dificultad de interpretar los resultados así como la escasa resolución taxonómica. Además, este método sólo permite el estudio de poblaciones bacterianas. En este sentido, el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resulta especialmente útil cuando queremos realizar una cuantificación relativa de una determinada cepa bacteriana o gen de resistencia.

Además, presenta otras importantes ventajas como son la sencillez del protocolo, rapidez, bajo coste, no necesita de disponer de secuenciadores masivos, capacidad para detectar genes diana que se encuentran en muy baja proporción, y una fácil interpretación de los resultados.

Sin embargo, esta técnica, al igual que los estudios de microbioma, presenta ciertas limitaciones. Cuando usamos este método para estudiar la carga relativa de EP-OXA (CR_{OXA-48}) o *S. marcescens* (CR_{Sm}) usando como calibrador un cultivo puro de *K.*

pneumoniae OXA-48 o *S. marcescens* asumimos dos principales posibles fuentes de error:

- a) El número de copias del gen de referencia, el ARNr 16S es variable entre las distintas especies.
- b) La proporción del número de copias del gen *bla*OXA-48 puede variar, bien por integración en el cromosoma o bien por aumento del número de copias del plásmido.

A pesar de eso, como comentamos anteriormente, el número de copias medio del gen ARNr 16S de las bacterias intestinales y dentro de las enterobacterias es relativamente estable. Además, sabemos que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* OXA-48 en nuestro medio presentan entre 3 y 4 de copias del gen *bla*OXA-48.

Además, la cuantificación relativa no permite estimar el número absoluto de bacterias y, por tanto, pacientes con un microbioma intestinal mermado por el uso de antibióticos pero con una pequeña población de EP-OXA podría dar como resultado una alta carga intestinal relativa. En ese caso, el mayor aumento del riesgo de infección podría deberse no tanto a la alta carga de EP-OXA sino a ser la única bacteria capaz de resistir la presión antibiótica. Aunque no podemos descartar este error, en nuestro trabajo hemos usado los ciclos de amplificación del gen del ARNr 16S como marcador de abundancia de bacterias, y no hemos encontrado diferencias significativas entre aquellos pacientes que habían recibido tratamiento antibiótico y los que no.

Otra limitación del estudio fue que la CR_{OXA-48} se midió únicamente en pacientes con al menos un cultivo rectal positivo para KpOXA-48. En el estudio con *S. marcescens* los pacientes con baja carga tenían menos posibilidades de tener cultivos positivos. De la misma forma, algunos pacientes podrían estar colonizados con una CR_{OXA-48} por debajo

del límite de detección del cultivo y por tanto podríamos estar sobreestimando la CR_{OXA-48} mediana real de los pacientes ingresados.

Cabe resaltar que, de confirmarse la utilidad clínica de los resultados obtenidos, esta técnica podría introducirse fácilmente en la rutina de un laboratorio de microbiología clínica. En los últimos años, las técnicas cuantitativas se han implantado de manera generalizada gracias al aumento de la demanda de técnicas de cuantificación de cargas de múltiples virus (CMV, VEB, VIH, VHC, VHB, BK, Adenovirus, Herpes 6 *etc.*) así como el desarrollo de sistemas totalmente automatizados capaces realizar una PCR partiendo de la muestra clínica.

Estudios recientes han demostrado que este método o similares pueden ser utilizados para cuantificar la carga intestinal de *K. pneumoniae* y que, en la línea de lo presentado en esta tesis, ésta podría estar relacionada tanto con el riesgo de sepsis como en el nivel de contaminación ambiental en la habitación del paciente [40-42].

El desarrollo de estas técnicas permite obtener un conocimiento íntimo de las dinámicas de determinadas especies y genes de resistencia dentro del microbioma bacteriano. En nuestro caso, la cuantificación de cepas bacterianas o genes de resistencia podría ser de utilidad dentro de los programas de uso prudente de antibióticos, localizando aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar infecciones por EPC o sumado a los protocolos de control de brotes nosocomiales identificando posibles superdiseminadores dentro de las unidades hospitalarias. Esto resaltaría una vez más que en ocasiones, en la microbiología clínica, puede ser tan importante la detección de un determinado patógeno como su cuantificación para predecir su comportamiento. La posibilidad de realizar este tipo de técnicas en tiempo real, ofreciendo resultados en 24 horas, abre un nuevo campo de estudio: la microbiología clínica cuantitativa aplicada a bacterias y genes de resistencia.

6. CONCLUSIONES

OBJETIVO PRIMARIO:

- El método de cuantificación relativa presentado en esta tesis puede ser usado para el seguimiento de las cargas intestinales tanto de genes de resistencia a carbapenémicos como de las cepas que los portan.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

A.

- Los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* OXA-48 durante un ingreso tienden a perder dichas cepas tras el alta hospitalaria. En su lugar, el plásmido portador de la carbapenemasa *bla*OXA-48 puede mantenerse durante bastante tiempo en la población de enterobacterias endógenas en ausencia de presión antibiótica.

B.

- La administración conjunta de lactulosa y lactitol en personas colonizadas de forma crónica por EP-OXA reduce de forma significativa en poco tiempo las cargas rectales de estas bacterias.
- Esta reducción es transitoria, tendiendo la carga rectal de EP-OXA a recuperarse tras la suspensión del tratamiento
- El tratamiento es seguro y podría ser explorado en otros contextos como pacientes recién dados de alta o ingresados.

C.

- La mayoría de los pacientes ingresados y colonizados por KpOXA-48 presentan altas cargas intestinales de la carbapenemasa *bla*OXA-48, lo que indica un fuerte desplazamiento de la microbiota normal por parte de estas bacterias.
- El tratamiento antibiótico eleva la CR_{OXA-48} y esta a su vez podría estar asociada con un mayor riesgo de infección.

- La CR_{OXA-48} se mantiene estable durante el ingreso en la mayoría de los pacientes, aunque esta puede modificarse en pocos días.
- Los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* ST11 presentan mayores CR_{OXA-48} que aquellos colonizados por clones no epidémicos.
- En los pacientes colonizados por el secuenciotipo 405, el tratamiento con carbapenémicos podría inducir un aumento de la CR_{OXA-48}. Por el contrario, los pacientes colonizados por el ST11 presentan altas cargas de *blaOXA-48* independientemente haber recibido o no tratamiento con carbapenémicos.
- Aunque la CR_{OXA-48} y la CR de la cepa epidémica están fuertemente relacionadas algunos pacientes presentan divergencias y además, éstas se pueden producir a lo largo del ingreso.

D.

- Durante un brote pediátrico por *S. marcescens*, los pacientes con cultivo rectal positivo tienen una CR_{Sm} más alta que aquellos con cultivo negativo pero qPCR positiva. Además, los pacientes con cultivo rectal positivo tienen mayor incidencia de infecciones.
- La CR_{Sm}, puede presentar importantes cambios durante el ingreso, pero tiende a reducirse progresivamente.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(15):E3463-E3470. doi:10.1073/pnas.1717295115
2. Guidelines for the Prevention and Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Health Care Facilities. Geneva: World Health Organization; 2017.
3. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ*. 2016;352:h6420. Published 2016 Feb 8. doi:10.1136/bmj.h6420
4. Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Viridi JS, Gulati P. Integrins in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(2):167-176. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004
5. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1121-1137. doi:10.1093/jac/dkx488
6. Paño Pardo JR, Serrano Villar S, Ramos Ramos JC, Pintado V. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: risk factors, clinical features and prognosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32 Suppl 4:41-48. doi:10.1016/S0213-005X(14)70173-9
7. David S, Reuter S, Harris SR, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4(11):1919-1929. doi:10.1038/s41564-019-0492-8
8. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65(2):208-215. doi:10.1093/cid/cix270

9. Paño-Pardo JR, López Quintana B, Lázaro Perona F, et al. Community-Onset Bloodstream and Other Infections, Caused by Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*: Epidemiological, Microbiological, and Clinical Features [published correction appears in Open Forum Infect Dis. 2017 Jun 17;4(2):ofx119]. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(3):ofw136. Published 2016 Aug 1. doi:10.1093/ofid/ofw136
10. Poole K, George R, Decraene V, et al. Active case finding for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a teaching hospital: prevalence and risk factors for colonization. *J Hosp Infect*. 2016;94(2):125-129. doi:10.1016/j.jhin.2016.06.019
11. Kassem A, Raed A, Michael T, et al. Risk factors and outcomes of patients colonized with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(10):1154-1161. doi:10.1017/ice.2020.266
12. Fang L, Lu X, Xu H, et al. Epidemiology and risk factors for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* colonisation and infections: case-controlled study from an academic medical center in a southern area of China. *Pathog Dis*. 2019;77(4):ftz034. doi:10.1093/femspd/ftz034
13. Marimuthu K, Ng OT, Chong BPZ, et al. Antecedent Carbapenem Exposure as a Risk Factor for Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(10):e00845-19. Published 2019 Sep 23. doi:10.1128/AAC.00845-19
14. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the

- Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill.* 2014;19(9):20723. Published 2014 Mar 6. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20723
15. Herruzo R, Ruiz G, Perez-Blanco V, et al. Bla-OXA48 gene microorganisms outbreak, in a tertiary Children's Hospital, Over 3 years (2012-2014): Case Report. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(40):e7665. doi:10.1097/MD.00000000000007665
 16. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(1):56-66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4
 17. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Navarro-San Francisco C, et al. Intestinal co-colonization with different carbapenemase-producing *Enterobacterales* isolates is not a rare event in an OXA-48 endemic area. *EClinicalMedicine*. 2019;15:72-79. Published 2019 Oct 17. doi:10.1016/j.eclinm.2019.09.005
 18. Göttig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VA. In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin Infect Dis.* 2015;60(12):1808-1815. doi:10.1093/cid/civ191
 19. Pérez-Vázquez M, Oteo J, García-Cobos S, et al. Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):887-896. doi:10.1093/jac/dkv458
 20. Cohen MJ, Block C, Levin PD, Schwartz C, Gross I, Weiss Y, Moses AE, Benenson S. Institutional control measures to curtail the epidemic spread of

- carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a 4-year perspective. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 Jul;32(7):673-8. doi: 10.1086/660358. PMID: 21666398.
21. Pérez-Blanco V, Redondo-Bravo L, Ruíz-Carrascoso G, et al. Epidemiology and control measures of an OXA-48-producing Enterobacteriaceae hospital-wide oligoclonal outbreak. *Epidemiol Infect*. 2018;146(5):656-662. doi:10.1017/S0950268818000249
 22. Catho G, Huttner BD. Strategies for the eradication of extended-spectrum beta-lactamase or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae intestinal carriage. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(8):557-569. doi:10.1080/14787210.2019.1645007
 23. Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, et al. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):807-817. doi:10.1016/j.cmi.2019.01.005
 24. Dinh A, Fessi H, Duran C, et al. Clearance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae vs vancomycin-resistant enterococci carriage after faecal microbiota transplant: a prospective comparative study. *J Hosp Infect*. 2018;99(4):481-486. doi:10.1016/j.jhin.2018.02.018
 25. Davido B, Batista R, Michelon H, et al. Is faecal microbiota transplantation an option to eradicate highly drug-resistant enteric bacteria carriage?. *J Hosp Infect*. 2017;95(4):433-437. doi:10.1016/j.jhin.2017.02.001
 26. Davido B, Batista R, Dinh A, et al. Fifty shades of graft: How to improve the efficacy of faecal microbiota transplantation for decolonization of antibiotic-resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(5):553-556. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.03.008

27. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, et al. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(7):830-838. doi:10.1016/j.cmi.2018.12.009
28. Sánchez-Ramírez C, Hípola-Escalada S, Cabrera-Santana M, et al. Long-term use of selective digestive decontamination in an ICU highly endemic for bacterial resistance. *Crit Care.* 2018;22(1):141. Published 2018 May 30. doi:10.1186/s13054-018-2057-2
29. Daneman N, Sarwar S, Fowler RA, Cuthbertson BH; SuDDICU Canadian Study Group. Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(4):328-341. doi:10.1016/S1473-3099(12)70322-5
30. De Simone C, Ciardi A, Grassi A, et al. Effect of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1992;14(1-2):331-340. doi:10.3109/08923979209009228
31. Kwon JH, Bommarito KM, Reske KA, et al. Randomized Controlled Trial to Determine the Impact of Probiotic Administration on Colonization With Multidrug-Resistant Organisms in Critically Ill Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36(12):1451-1454. doi:10.1017/ice.2015.195
32. Dall LB, Lausch KR, Gedebjerg A, Fursted K, Storgaard M, Larsen CS. Do probiotics prevent colonization with multi-resistant Enterobacteriaceae during travel? A randomized controlled trial. *Travel Med Infect Dis.* 2019;27:81-86. doi:10.1016/j.tmaid.2018.11.013

- 33.** Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*. 2018;562(7728):532-537. doi:10.1038/s41586-018-0616-y
- 34.** Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM. *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(4):610. Published 2019 Feb 20. doi:10.3390/ijerph16040610
- 35.** Redondo-Bravo L, Gutiérrez-González E, San Juan-Sanz I, et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatology unit of a Spanish tertiary hospital: Risk factors and control measures. *Am J Infect Control*. 2019;47(3):271-279. doi:10.1016/j.ajic.2018.08.026
- 36.** Friedman ND, Kotsanas D, Brett J, Billah B, Korman TM. Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal unit via a case-control study and molecular typing. *Am J Infect Control*. 2008;36(1):22-28. doi:10.1016/j.ajic.2006.12.012
- 37.** David MD, Weller TM, Lambert P, Fraiese AP. An outbreak of *Serratia marcescens* on the neonatal unit: a tale of two clones. *J Hosp Infect*. 2006;63(1):27-33. doi:10.1016/j.jhin.2005.11.006
- 38.** Madani TA, Alsaedi S, James L, et al. *Serratia marcescens*-contaminated baby shampoo causing an outbreak among newborns at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Hosp Infect*. 2011;78(1):16-19. doi:10.1016/j.jhin.2010.12.017
- 39.** Cullen MM, Trail A, Robinson M, Keaney M, Chadwick PR. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit prompting review of decontamination of laryngoscopes. *J Hosp Infect*. 2005;59(1):68-70. doi:10.1016/j.jhin.2004.08.003

40. Shimasaki T, Seekatz A, Bassis C, et al. Increased Relative Abundance of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* Within the Gut Microbiota Is Associated With Risk of Bloodstream Infection in Long-term Acute Care Hospital Patients. *Clin Infect Dis*. 2019;68(12):2053-2059. doi:10.1093/cid/ciy796
41. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):905-914. doi:10.1093/cid/cis580
42. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(5):470.e1-470.e4707. doi:10.1016/j.cmi.2014.12.015
43. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13(8):1103-1108. doi:10.1046/j.1365-2036.1999.00560.x
44. Chen RM, Wu JJ, Lee SC, Huang AH, Wu HM. Increase of intestinal Bifidobacterium and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion. *J Dairy Sci*. 1999;82(11):2308-2314. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75479-2
45. Song EJ, Lee ES, Nam YD. Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *J Microbiol*. 2018;56(10):693-705. doi:10.1007/s12275-018-8238-5
46. Velásquez-Mejía EP, de la Cuesta-Zuluaga J, Escobar JS. Impact of DNA extraction, sample dilution, and reagent contamination on 16S rRNA gene

- sequencing of human feces. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(1):403-411.
doi:10.1007/s00253-017-8583-z
47. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*. 2017;35(11):1069-1076.
doi:10.1038/nbt.3960
48. Greathouse KL, Sinha R, Vogtmann E. DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization. *Genome Biol*. 2019;20(1):212. Published 2019 Oct 21. doi:10.1186/s13059-019-1843-8
49. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
50. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*. 2004;5:3. Published 2004 Feb 5.
doi:10.1186/1471-2172-5-3
51. Lerner A, Romano J, Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y. Rectal swabs are suitable for quantifying the carriage load of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(3):1474-1479. doi:10.1128/AAC.01275-12
52. Rao K, Seekatz A, Bassis C, Sun Y, Mantlo E, Bachman MA. *Enterobacterales* Infection after Intestinal Dominance in Hospitalized Patients. *mSphere*. 2020;5(4):e00450-20. Published 2020 Jul 22.
doi:10.1128/mSphere.00450-20

- 53.** Niehus R, van Kleef E, Mo Y, et al. Quantifying antibiotic impact on within-patient dynamics of extended-spectrum beta-lactamase resistance. *Elife*. 2020;9:e49206. Published 2020 May 7. doi:10.7554/eLife.49206
- 54.** Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BR, Schmidt TM. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D593-D598. doi:10.1093/nar/gku1201
- 55.** Swayne RL, Ludlam HA, Shet VG, Woodford N, Curran MD. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(1):35-38. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.03.010
- 56.** Yang S, Lin S, Kelen GD, et al. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3449-3454. doi:10.1128/jcm.40.9.3449-3454.2002
- 57.** López-Camacho E, Rentero Z, Ruiz-Carrascoso G, et al. Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(11):O891-O893. doi:10.1111/1469-0691.12616
- 58.** Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [published correction appears in Nat Biotechnol. 2019 Sep;37(9):1091]. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9
- 59.** Joyner J, Wanless D, Sinigalliano CD, Lipp EK. Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(5):1679-1683. doi:10.1128/AEM.02755-13

60. Feldman, N., Adler, A., Molshatzki, N., Navon-Venezia, S., Khabra, E., Cohen, D., & Carmeli, Y. (2013). Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(4), E190–E196. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12099>
61. Le Bastard Q, Al-Ghalith GA, Grégoire M, et al. Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(3):332-345. doi:10.1111/apt.14451
62. Kontopoulou K, Iosifidis E, Antoniadou E, et al. The clinical significance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* rectal colonization in critically ill patients: from colonization to bloodstream infection. *J Med Microbiol.* 2019;68(3):326-335. doi:10.1099/jmm.0.000921
63. Escribano E, Saralegui C, Moles L, et al. Influence of a *Serratia marcescens* outbreak on the gut microbiota establishment process in low-weight preterm neonates. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216581. Published 2019 May 21. doi:10.1371/journal.pone.0216581
64. Drakoularakou A, Hasselwander O, Edinburgh M, Ouwehand AC. Lactitol, an emerging prebiotic: functional properties with a focus on digestive health. *Food Sci Tech Bull Funct Foods* (2007) 3(7):71–80.10.1616/1476-2137.14685
65. van Loon K, Voor In 't Holt AF, Vos MC. A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;62(1):e01730-17. Published 2017 Dec 21. doi:10.1128/AAC.01730-17

- 66.** Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164(3):337-340. doi:10.1016/j.cell.2016.01.013
- 67.** Pascual Á, Pintado V, Rodríguez-Baño J, Miró JM. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: the end of the antibiotic era?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32 Suppl 4:1-3. doi:10.1016/S0213-005X(14)70167-3
- 68.** Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- 69.** Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(1):89-96. doi:10.1093/jac/dks364
- 70.** Freedberg, D. E., Zhou, M. J., Cohen, M. E., Annavaiahala, M. K., Khan, S., Moscoso, D. I., Brooks, C., Whittier, S., Chong, D. H., Uhlemann, A. C., & Abrams, J. A. (2018). Pathogen colonization of the gastrointestinal microbiome at intensive care unit admission and risk for subsequent death or infection. *Intensive care medicine*, 44(8), 1203–1211. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5268-8>

8. APÉNDICE:

ARTÍCULOS

PUBLICADOS DURANTE


ESTA TESIS

RESEARCH

Open Access



Proof-of-concept trial of the combination of lactitol with *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* for the eradication of intestinal OXA-48-producing *Enterobacteriaceae*

Juan Carlos Ramos-Ramos¹, Fernando Lázaro-Perona², José Ramón Arribas¹, Julio García-Rodríguez², Jesús Mingorance^{2*} , Guillermo Ruiz-Carrascoso², Alberto M. Borobia³, José Ramón Paño-Pardo^{1,6,7}, Rafael Herruzo⁴ and Francisco Arnalich⁵

Abstract

Background: The major reservoir of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) is the gastrointestinal tract of colonized patients. Colonization is silent and may last for months, but the risk of infection by CPE in colonized patients is significant.

Methods: Eight long-term intestinal carriers of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* (OXA-PE) were treated during 3 weeks with daily oral lactitol (Emportal[®]), *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* (Infloran[®]). Weekly stool samples were collected during the treatment period and 6 weeks later. The presence of OXA-PE was investigated by microbiological cultures and qPCR.

Results: At the end of treatment (EoT, secondary endpoint 1), four of the subjects had negative OXA-PE cultures. Three weeks later (secondary endpoint 2), six subjects were negative. Six weeks after the EoT (primary endpoint), three subjects had negative OXA-PE cultures. The relative intestinal load of OXA-PE decreased in all the patients during treatment.

Conclusions: The combination of prebiotics and probiotics was well tolerated. A rapid reduction on the OXA-PE intestinal loads was observed. At the EoT, decolonization was achieved in three patients.

Clinical Trials Registration: NCT02307383. EudraCT Number: 2014-000449-65.

Keywords: OXA-48-producing *Enterobacteriaceae*, Intestinal colonization, Prebiotics, Probiotics, Carbapenemases

Introduction

OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* (OXA-PE) are part of the global epidemic of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), a problem that has spread to many hospitals around the world. In December 2010, an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* was identified in our hospital, and since then we have

*Correspondence: jesus.mingorance@idipaz.es

² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPaz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

faced an endemic situation that has involved hundreds of patients [1].

The major reservoir of CPE is the gastrointestinal tract of the colonized patients. This might complicate the control of outbreaks since colonization may be silent and may last for months [2, 3]. The identification and isolation of colonized patients is one of the key strategies for the control of the CPE transmission.

One supportive measure for the control of colonization is selective intestinal decontamination of CPE by oral non-absorbable antibiotics active against aerobic gram-negative rods (generally colistin and aminoglycosides). This measure is used as a prophylaxis to prevent intestinal translocations in neutropenic patients, and also for prevention of pneumonia associated with mechanical ventilation in intensive care units. Using these antibiotics might be accompanied by a certain risk of promoting antibiotic resistance, but several studies have found it to be non-significant [4, 5].

Another strategy recently proposed for the control of colonization by CPE is the use of probiotics to displace them. Probiotics are live microorganisms (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) that may induce beneficial changes in the gut microbiome and modulate the immunologic status of the patient [6]. Probiotics may be co-administered with prebiotics, non-absorbable compounds (such as lactulose and lactitol) that are metabolized by the gut microbiota and selectively favor the proliferation of microorganisms such as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. Lactitol acts through decreasing the intestinal pH to favor the growth of acidophilic microbiota while inhibiting the growth of *Enterobacteriaceae* [7].

Some studies have reported beneficial effects of using probiotics for the eradication of pathogenic bacteria [8], though others found no significant effects [9–11]. No studies exist regarding the use of probiotics for the decolonization of CPE in chronic and long-term carriers.

Therefore, the objective of this work was to evaluate the safety and efficacy of the co-administration of prebiotics (lactitol) and probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) in reducing the intestinal colonization of OXA-PE in long-term carriers with normal nutritional and immunological statuses.

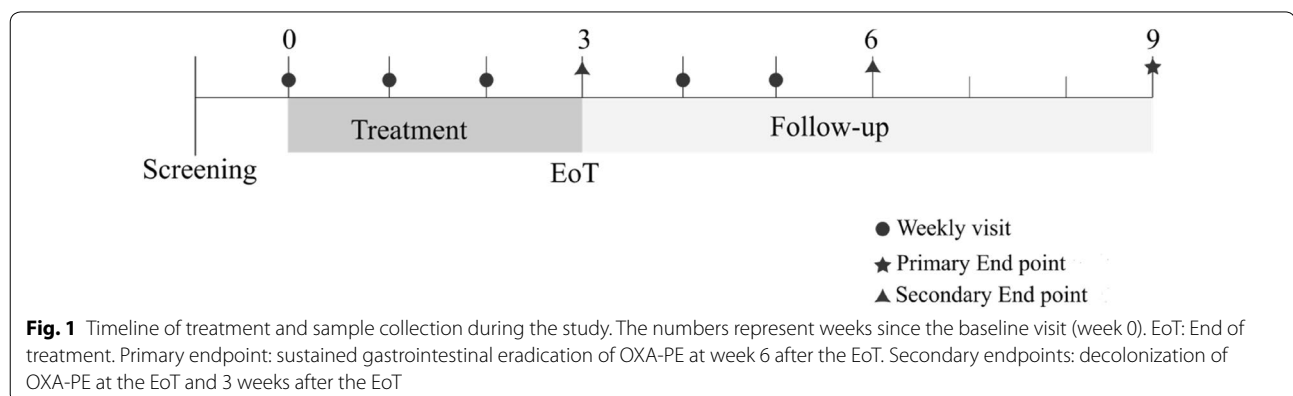
Results

Study design

We designed a single arm, open label, pilot clinical trial with long-term carriers of OXA-PE to evaluate the efficacy of the oral administration of probiotics (Infloran®, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*, 2×10^9 CFU tid-po) and prebiotics (Emportal®, lactitol 10 g tid) during 3 weeks, in order to evaluate intestinal decolonization. The trial was registered with EudraCT (Number: 2014-000449-65) and ClinicalTrials.gov (Identifier: NCT02307383). Inclusion criteria were subjects between 18 and 75 years old that had been colonized by OXA-PE during a previous hospitalization, continued being colonized for more than 6 months and had a positive screening of OXA-PE upon recruitment (exclusion criteria are detailed in section “Methods”).

The hospital records for 918 patients that had been colonized by OXA-48-producing *K. pneumoniae* in the period between 2010 and 2014 were reviewed and 22 subjects were found to meet all the inclusion and exclusion criteria. Eight of them had a positive initial screening and agreed to participate in the study.

The subjects were given the treatment for 3 weeks, and monitoring was performed through weekly visits during the treatment period, and continued for another 6 weeks afterwards (Fig. 1). During these visits, side effects were monitored and the stool samples analyzed in this study were taken. No adverse events were reported, including hepatic, renal, blood count and electrolytic disturbances. The tolerability of the treatment was good, and the only side effects related with the use of lactitol were flatulency



in 4/8 (50%) of the subjects and mild diarrhea that disappeared spontaneously without stopping lactitol in 1/8 (12.5%) of the subjects. All side effect symptoms disappeared after the withdrawal of lactitol.

Treatment outcomes

Six weeks after the EoT (week 9, primary endpoint) three subjects (37.5%) had negative cultures of OXA-PE, with two of them having had negative cultures in the last three visits of the study (weeks 5, 6 and 9). Regarding the secondary end points, four of the subjects (50%) had negative cultures for OXA-PE at the EoT (week 3), and that number increased to six (75%) 3 weeks after the EoT (week 6).

Overall, six of the subjects presented intermittent negative cultures during the whole study. In one of the subjects the cultures for OXA-PE were positive in all the samples, and in another subject no OXA-PE was recovered throughout the study.

Monitoring of the relative load of OXA-PE during treatment

The relative abundance of OXA-PE could be determined in six subjects. The remaining two had negative qPCR for *bla*_{OXA-48} in all the samples, despite having positive cultures. In the six subjects with positive qPCR results, the baseline logarithm of the fraction of OXA-PE relative to the total fecal bacteria ranged from -1.21 to -4.47 , which is 6.15% and 0.003% of the total bacterial population, respectively (Fig. 2). After 2 weeks of oral treatment, the OXA-PE fraction showed a reduction of more than one logarithm in all cases. The relative loads for the three subjects that had a baseline load of OXA-PE below -3 reached undetectable levels, while the reduction ranged between 1.13 and 2.55 logarithms in the other three subjects. In all of these subjects, the samples obtained after the end of treatment showed transitory increases of the relative OXA-PE loads, but the relative loads at the end of the study were varied: in two subjects, OXA-PE was no longer detectable by qPCR, one subject had a reduction of three logarithms, two subjects almost recovered the baseline levels, and the last subject had an increase in the relative abundance of OXA-PE (Fig. 2).

Discussion

In this study, we have tested the efficacy of 3 weeks of oral treatment with a combination of lactitol and probiotics (*Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*) for intestinal decolonization of OXA-PE in eight healthy volunteers that were long-term carriers. The period of treatment was set for 3 weeks based on previous experience that suggested a minimum of 1 week of treatment in order to be able to evaluate its efficacy. Safety and tolerance throughout the study's period were

good and treatment costs were moderate (on the order of 50€). Apparent decolonization of OXA-PE six weeks after the EoT (week 9, primary endpoint) was achieved in three subjects (37.5%). The relative intestinal load of OXA-PE consistently decreased in all six tested subjects during treatment, in three of them below detectable levels. The fact that in all of them increased again after the EoT shows that colonization may persist with loads below the limits of detection and suggests that longer treatments might be needed to effectively reach decolonization. Six weeks after the EoT, the OXA-PE loads in five out of the six subjects were reduced with respect to their initial values. The decolonization rate obtained in our study, without using antibiotics, was similar to the values reported at 1 or 3 months of treatment in several studies with non-absorbable antibiotic decolonization regimes (25%) [12]. Similar results have been obtained with fecal microbiome transplantation (FMT) without antibiotics [13–15], though the FMT protocols need further testing and standardization for CPE eradication [16, 17].

It has been shown that CPE are spontaneously cleared from the intestine after some time [18], and indeed, 14 out of the 22 candidates that met the inclusion and exclusion criteria of our study had already become negative before the onset of the study. The time since discharge was longer in these 14 subjects than in the 8 positive subjects [3], suggesting that spontaneous clearance would eventually occur in these subjects as well. In the positive subjects, the original hospital-acquired strains have been lost, and the OXA-48 plasmid was maintained in endogenous, non-multi-resistant strains of *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* or *Escherichia coli* [3]. The selection of long-term carriers was intended to reduce the probability of spontaneous decolonization during the treatment period. Therefore, the drastic reduction of the OXA-PE load in all of the subjects during the first 2 weeks of treatment suggests that it was an effect of the treatment. Nevertheless, a placebo control could not be included in this study due to the small sample size of the subjects.

The importance of our results lies in the fact that higher loads of CPE are associated with increased contamination of the environment surrounding the colonized patients [19] and a higher risk of spread to other wards and patients. Therefore, decreasing the intestinal loads of OXA-PE might be an effective way to reduce the risk of cross-transmission in wards harboring colonized patients. Moreover, the decrease of the OXA-PE loads below the detection limits can also reduce the risk of developing an infections during hospitalization [20–22]. This could be useful in situations where programmed surgical procedures are to be performed and for managing critically ill patients, especially since the decrease of

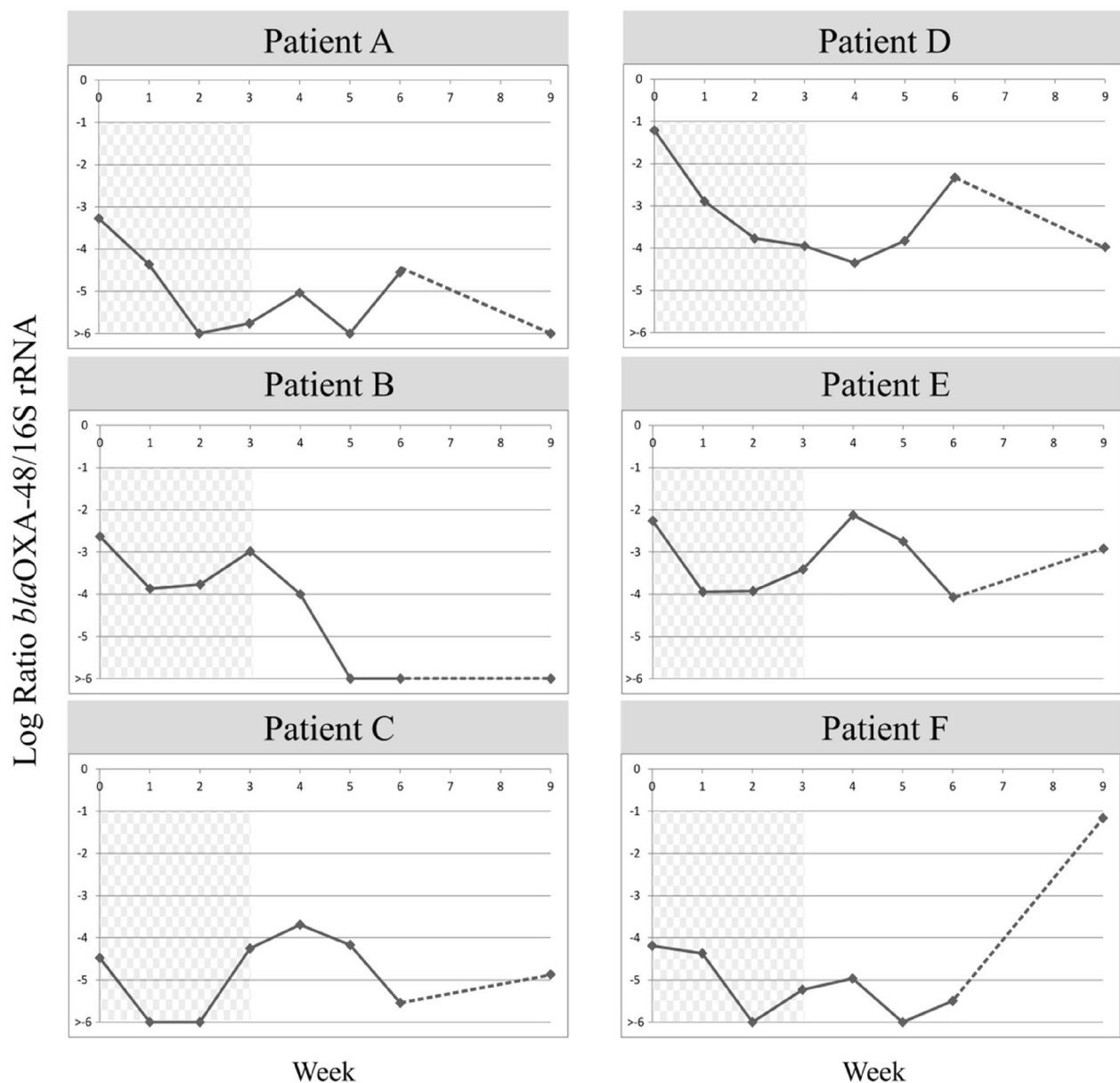


Fig. 2 Evolution of the relative intestinal load of OXA-PE during the study. The horizontal axis shows weeks since the beginning of treatment, starting at the baseline visit. The darkened area highlights the treatment period. The discontinuous line represents the lapse of time between the samples obtained at the third and sixth weeks after EoT

the OXA-PE loads after the onset of treatment was fast and maintained throughout the treatment.

One of the weaknesses of our study is the small size of the study group that is not representative of the entire population of OXA-PE carriers. This was the result of the strict exclusion criteria that were put in place in order to avoid biases related to concurrent treatments

or morbidities. Nevertheless, our results show that the combined use of probiotics and prebiotics has a rapid impact on the intestinal load of OXA-PE with minimal side effects. In line with recently published EUCAST guidelines [23], this strategy should be further explored among selected hospitalized patient groups who might benefit from a decrease in the intestinal OXA-PE load.

Conclusions

The combination of prebiotics and probiotics was well tolerated and a rapid reduction on the OXA-PE intestinal loads was observed during the treatment. At the EoT apparent decolonization was achieved in three out of eight patients.

Methods

Subject recruitment

Eligible subjects were adults between 18 and 75 years of age, of both genders, that had been colonized by OXA-PE during hospitalization, maintained the colonization for more than 6 months and had a positive screening of OXA-PE upon recruitment. They were recruited by a phone call and a personal interview. The exclusion criteria were: hospitalization due to acute pathologies, systemic antibiotic or glucocorticoid treatments during the previous month, diarrhea 1 month before initiating the treatment, allergy or intolerance to lactitol, lactulose or probiotics, electrolytic alterations ($K^+ < 3$ mEq/L, $Mg^{++} < 1.8$ mEq/L, $Ca^{++} < 8$ mg/dL), neutropenia ($< 100 \times 10^3/\mu L$), chemotherapy or immunosuppressive treatment, liver dysfunction (ASAT/ALAT > 5 times the upper limit, AP > 3 times the upper limit, or bilirubin > 2 mg/dl), chronic renal failure (GFR < 30 ml/min), poorly controlled diabetes (HbA1c > 8 mmol/mol), endovascular prosthesis and severe valvulopathy [3].

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. It was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario La Paz on May 8th, 2014, with code number: 4131 and EudraCT number: 2014-000449-65, and by the Spanish Drugs Agency, AEMPS, on July 7th, 2014. All subjects received written and spoken information about the study during their interviews and were informed of the opportunity to participate in the study and ability to withdraw at any time without penalties. Signed informed consent was obtained from all the study's subjects.

Primary and secondary endpoints

The primary endpoint was the sustained gastrointestinal (GI) eradication of OXA-PE 6 weeks after the end of treatment (EoT). The secondary endpoints were the GI decolonization of OXA-PE at the EoT and 3 weeks after the EoT.

Study procedures

Visits were performed once a week during the first 6 weeks (3 weeks of intervention and 3 weeks of follow-up period), and a final visit was performed at week 9 (6 weeks after the end of the treatment). A rectal swab was taken for the initial screening during the first visit,

and stool samples were obtained throughout the following visits. If the initial screening was positive for OXA-PE, the subject was included in the study and a second visit was planned where the treatment begun. Blood tests were performed at the initial screening and the EoT to analyze hepatic and renal functions, blood counts and electrolytic disturbances. Safety and tolerability were evaluated every week since the initiation of treatment through a medical visit and physical examination.

The efficacy of the intervention was primarily evaluated 6 weeks after the EoT (sustained response) and secondarily at the EoT and 3 weeks after the EoT. The effect of the treatment on intestinal colonization by OXA-PE was monitored during the treatment period and the three following weeks using the stool samples received during every visit.

OXA-PE identification

Rectal swabs were inoculated on OXA-PE selective agar media (chromID™ OXA-48, bioMérieux), and tryptic soy broth containing an ertapenem disk (1 µg/ml), and incubated for 18 h at 37 °C. After incubation, the broth was plated on the same agar selective medium and incubated another 18 h at 37 °C. Stool samples were processed in the same way, with the exception that before plating, a small portion of stool samples (around 0.1 g) was suspended in 0.5 ml of 0.9% saline that was used to inoculate the media. Isolates were identified using MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics) and real time PCR (OXVIK, Progenie Molecular®) was used to confirm the presence of the *bla*_{OXA-48} gene.

Molecular methods

For DNA extraction, rectal swabs or 0.1 g of stool samples were suspended in 1 ml of saline solution (0.9% Sodium Chloride solution, Fresenius Kabi) and lysed by heating at 95 °C during 20 min. Samples were then centrifuged 1 min at 12,000 rpm to eliminate solid residues and DNA in the supernatant was extracted using the automated MagPurix® system (Zinexts Life Science Corp.). For characterization of qPCR parameters, 1 ml of a 0.5 McFarland suspension of an OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolate was extracted using the method described above. Primers and TaqMan probes targeting the *bla*_{OXA-48} gene [24] and the *16S rRNA* gene [25] were used as previously described. Both probes were designed with the FAM reporter dye.

qPCRs were carried out in two parallel assays targeting the *bla*_{OXA-48} gene and the *16S rRNA* gene. Each reaction tube contained 0.1 µM of the specific probe, 1 µM of each forward and reverse primers, 10 µl of Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc.), 2.8 µl of molecular biology-grade water and 5 µl of template DNA. Reactions were carried out on

the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) with the following cycling conditions: One holding period of 10 min at 95°C followed by 45 two-step cycles consisting of 30 s at 95°C and 1 min at 60°C. The Threshold cycles (C_t) were automatically calculated by the PCR system.

The linear ranges and the limits of detection of qPCRs targeting both *16SrRNA* and *bla*_{OXA-48} were determined using tenfold serial dilutions of DNA extracted from 1 ml of a 0.5 McFarland suspension of an OXA-48-producing *K. pneumoniae*. For both qPCRs, we established the linear range over 1000,000-fold range dilutions and created a standard curve. Efficiency (Ef) was calculated based on the standard curve slope ($Ef = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$). Individual qPCR parameters were analyzed with LinRegPCR 11 [26]. The linear range of the qPCR_{16S} was maintained for five logarithmic dilutions (8–4 log CFU/ml, $R^2 = 0.992$), and the linear range of qPCR_{OXA-48} for seven logarithmic dilutions (8–2 log CFU/ml, $R^2 = 0.997$). Efficiencies for qPCR_{16S} and qPCR_{OXA-48} were 1.847 and 1.850, respectively. The limit of detection was set below 100 CFU/ml for both *16SrRNA* and *bla*_{OXA-48} (Fig. 3a). The effect of DNA dilution on the ΔC_t was calculated in the OXA-48-producing *K. pneumoniae* strain, and three rectal swabs obtained from colonized patients. Variation of the ΔC_t with respect to template dilution was considered insignificant when the slope of the log CFU/ml– ΔC_t curve is close to 0 (Fig. 3b, c). The efficiency of the qPCR was found to be independent from the sample or the DNA dilution. All reactions were carried out by duplicate for stool samples or triplicate for the standard curves and qPCR testing.

DNA from stool samples was diluted tenfold in order to avoid PCR inhibition. When no detection of the *bla*_{OXA-48} gene was possible, non-diluted DNA was used, and 100-fold dilutions were used in case of PCR inhibition or when the C_t values were out of the linearity range. Intestinal loads were calculated from the difference between the C_t of the qPCR targeting the *bla*_{OXA-48} and the C_t of the reference gene, the *16SrRNA*, using the $2^{-\Delta C_t}$ method [27, 28]. In order to use the method, several requirements had to be met. Mainly, the efficiencies of the two qPCRs had to be similar and > 80%, and the dilution of the DNA template should not influence the ΔC_t results. These conditions were met in our validation experiments described above. Moreover, the ΔC_t method assumes a one-to-one ratio of *bla*_{OXA-48} to *16SrRNA* genes per cell. We detected an average of three copies per cell of the *bla*_{OXA-48} gene in *K. pneumoniae*, and have calculated that an average of four copies of the *16SrRNA* per cell across the organisms that typically populate the intestinal microbiome (median value) using the *rrnDB* database (<https://rrnodb.umms.med.umich.edu/>).

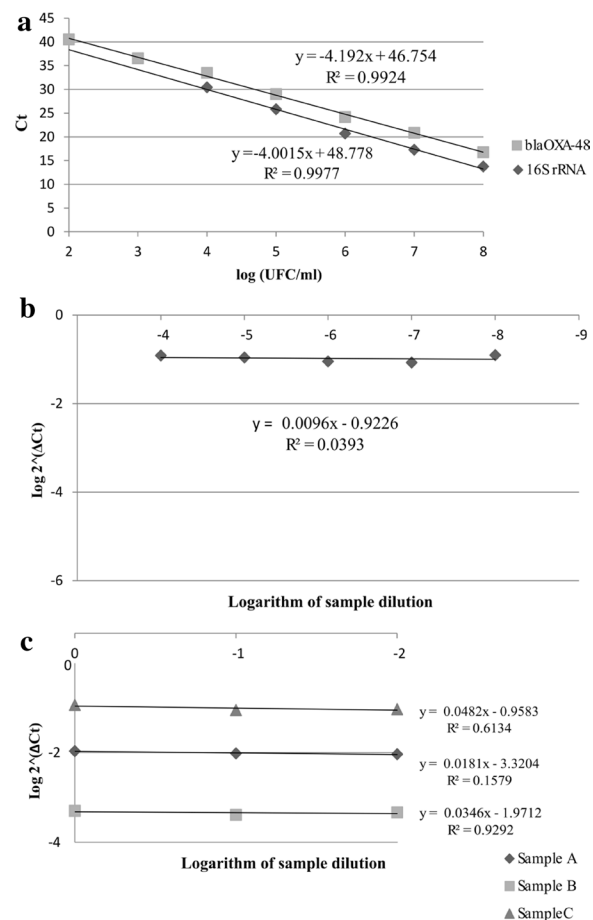


Fig. 3 Validation of the qPCR Reactions. **a** Determination of linearity and the limit of detection for the two qPCR reactions using tenfold serial dilutions of DNA extracted from 1 ml of a 0.5 McFarland suspension of an OXA-48-producing *K. pneumoniae*. **b** The log ratio of the two qPCR reactions plotted against tenfold serial dilutions of the OXA-48-producing *K. pneumoniae*. **c** The log ratio of the two qPCR reactions plotted against tenfold serial dilutions of rectal swabs having different loads of *bla*_{OXA-48}

Acknowledgements

We wish to acknowledge the individuals who voluntarily participated in the study. We are grateful to Dr. Elias Dahdouh for stimulating and thought-provoking discussions.

Authors' contributions

Study design: JCRR, JRA, JGR, JM, GRC, JRPP, RH, FA. Implementation of interventions: JCRR, FA. Clinical data collection: JCRR, AMB, FA. qPCR design and execution, validation and analysis: FLP, JM. Microbiological study: FLP, JGR, GRC. Data interpretation and discussion: JCRR, FLP, JRA, JGR, JM, GRC, JRPP, RH, FA. Manuscript writing: JCRR, FLP, JM. Manuscript revision and approval: all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The trial "Pilot Study of the Effectiveness of Probiotics and Lactitol for the Decolonization of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Among Rectal Carriers" was funded by IdiPAZ (code: Desprobioxa), and supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III [PI13/01218 and PI14/01832 to J.M. and J.R. P.-P. respectively].

Co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario La Paz on May 8th, 2014, with code number: 4131 and EudraCT number: 2014-000449-65, and by the Spanish Drugs Agency, AEMPS, on July 7th, 2014. All the subjects included signed informed consent.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors report no conflict of interest.

Author details

¹ Unidad de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. ² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPaz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. ³ Departamento de Farmacología Clínica, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. ⁴ Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. ⁵ Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. ⁶ Present Address: Division of Infectious Diseases, Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”, Zaragoza, Spain. ⁷ Present Address: Instituto de Investigaciones Sanitarias (IIS) de Aragón, Zaragoza, Spain.

Received: 15 October 2019 Accepted: 31 March 2020

Published online: 07 April 2020

References

- Pérez-Blanco V, Redondo-Bravo L, Ruiz-Carrascoso G, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Robustillo-Rodela A, et al. Epidemiology and control measures of an OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* hospital-wide oligoclonal outbreak. *Epidemiol Infect.* 2018;146:656–62. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000249>.
- Feldman N, Adler A, Molshatzki N, Navon-Venezia S, Khabra E, Cohen D, et al. Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E190–6.
- Lázaro-Perona F, Ramos JCC, Sotillo A, Mingorance J, García-Rodríguez J, Ruiz-Carrascoso G, et al. Intestinal persistence of a plasmid harbouring the OXA-48 carbapenemase gene after hospital discharge. *J Hosp Infect.* 2019;101:175–8.
- Daneman N, Sarwar S, Fowler RA, Cuthbertson BH, SuDDICU Canadian Study Group. Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:328–41.
- Sánchez-Ramírez C, Hípola-Escalada S, Cabrera-Santana M, Hernández-Viera MA, Caipe-Balcázar L, Saavedra P, et al. Long-term use of selective digestive decontamination in an ICU highly endemic for bacterial resistance. *Crit Care.* 2018;22:1–11.
- De Simone C, Ciardi A, Grassi A, Lambert Gardini S, Tzantzoglou S, Trinchieri V, et al. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1992;14:331–40.
- Drakoularakou A, Hasselwander O, Edinburgh M, Ouwehand AC. Lactitol, an emerging prebiotic: functional properties with a focus on digestive health. *Food Sci Technol Bull Funct Foods.* 2007;3:71–80.
- Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo H-S, Villaruz AE, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature.* 2018;562:532–7.
- De Regt MJA, Willems RJJ, Hené RJ, Siersema PD, Verhaar HJJ, Hopmans TEM, et al. Effects of probiotics on acquisition and spread of multiresistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2801–5.
- Kwon JH, Bommarito KM, Reske KA, Seiler SM, Hink T, Babcock HM, et al. Randomized controlled trial to determine the impact of probiotic administration on colonization with multidrug-resistant organisms in critically ill patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36:1451–4.
- Catho G, Huttner BD. Strategies for the eradication of extended-spectrum beta-lactamase or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriage. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1645007>.
- Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* carriage: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2729–39.
- Dinh A, Fessi H, Duran C, Batista R, Michelon H, Bouchand F, et al. Clearance of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* vs vancomycin-resistant enterococci carriage after faecal microbiota transplant: a prospective comparative study. *J Hosp Infect.* 2018;99:481–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.02.018>.
- David B, Batista R, Michelon H, Lepointeur M, Bouchand F, Lepeule R, et al. Is faecal microbiota transplantation an option to eradicate highly drug-resistant enteric bacteria carriage? *J Hosp Infect.* 2017;95:433–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.02.001>.
- Bilinski J, Grzesiowski P, Sorensen N, Madry K, Muszynski J, Robak K, et al. Faecal microbiota transplantation in patients with blood disorders inhibits gut colonization with antibiotic-resistant bacteria: results of a prospective. *Single Center Study Clin Infect Dis.* 2017;65:364–70.
- David B, Batista R, Dinh A, de Truchis P, Terveer EM, Roberts B, et al. Fifty shades of graft: how to improve the efficacy of faecal microbiota transplantation for decolonization of antibiotic-resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53:553–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.03.008>.
- Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, et al. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:830–8.
- Haverkate MR, Weiner S, Lolans K, Moore NM, Weinstein RA, Bonten MJM, et al. Duration of colonization with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria at long-term acute care hospitals in Chicago, Illinois. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3:1–4.
- Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:470.e1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.015>.
- Gorrie CL, Mirc Eta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnelli RA, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin Infect Dis.* 2017;65:208–15.
- Freedberg DE, Zhou MJ, Cohen ME, Annavajhala MK, Khan S, Moscoso DI, et al. Pathogen colonization of the gastrointestinal microbiome at intensive care unit admission and risk for subsequent death or infection. *Intensive Care Med.* 2018;44:1203–11. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5268-8>.
- Shimasaki T, Seekatz A, Bassis C, Rhee Y, Yelin RD, Fogg L, et al. Increased relative abundance of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* within the gut microbiota is associated with risk of bloodstream infection in long-term acute care hospital patients. *Clin Infect Dis.* 2019;68:2053–9.
- Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, Bragantini D, Eggimann P, Huttner BD, et al. ESCMID-EUCLIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:807–17.
- Swayne RL, Ludlam HA, Shet VG, Woodford N, Curran MD. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:35–8.
- Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, et al. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3449–54. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3449-3454.2002>.

26. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e45.
27. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 2004;5:3.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001;25:402–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Accepted Manuscript

Intestinal persistence of a plasmid harboring the OXA-48 carbapenemase gene after hospital discharge

F. Lazaro-Perona, Pharm, J.C. Ramos, MD, A. Sotillo, PhD, J. Mingorance, PhD, J. García-Rodríguez, PhD, G. Ruiz-Carrascoso, PhD, J.R. Paño-Pardo, PhD, J.R. Arribas, MD, R. Herruzo, PhD, F. Arnalich, PhD

PII: S0195-6701(18)30368-2

DOI: [10.1016/j.jhin.2018.07.004](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.07.004)

Reference: YJHIN 5482

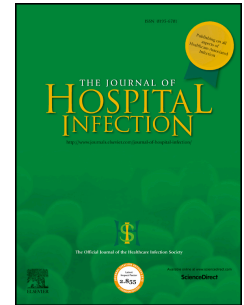
To appear in: *Journal of Hospital Infection*

Received Date: 31 May 2018

Accepted Date: 5 July 2018

Please cite this article as: Lazaro-Perona F, Ramos J, Sotillo A, Mingorance J, García-Rodríguez J, Ruiz-Carrascoso G, Paño-Pardo J, Arribas J, Herruzo R, Arnalich F, Intestinal persistence of a plasmid harboring the OXA-48 carbapenemase gene after hospital discharge, *Journal of Hospital Infection* (2018), doi: 10.1016/j.jhin.2018.07.004.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Intestinal persistence of a plasmid harboring the OXA-48 carbapenemase gene after hospital discharge

Authors: Lazaro-Perona F¹, Pharm, Ramos JC², MD, Sotillo A¹, PhD, Mingorance J¹, PhD, García-Rodríguez J¹, PhD, Ruiz-Carrascoso G¹, PhD, Paño-Pardo JR², PhD, Arribas JR², MD, Herruzo R³, PhD, Arnalich F⁴, PhD.

¹ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPaz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

² Unidad de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

³ Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

⁴ Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

Address correspondence to Jesús Mingorance, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain (jesus.mingorance@idipaz.es)

Running title: OXA-48 persistence in outpatients

Summary

To study intestinal colonisation by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* (KpO48) after hospital discharge, stool samples from twenty-two previously colonised subjects were collected. Time from discharge was 33 to 611 days, without readmissions. Eight subjects (36%) were identified as *bla*OXA-48 gene carriers. In all of them the hospital-acquired strain of KpO48 had been lost, and the gene was harboured by other strains of *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and/or *E. coli*. Our findings show intestinal persistence for several months of a plasmid harboring the OXA-48 carbapenemase gene in a significant proportion of individuals in the absence of antibiotic treatment.

Keywords: intestinal colonisation; OXA-48; carbapenemase; *Klebsiella pneumoniae*;

Enterobacteriaceae

In many healthcare facilities, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CPKP) outbreaks are drifting towards an endemic situation in which infections are usually the tip of the iceberg and most affected patients are asymptomatic intestinal carriers. In most cases, the CPKP is cleared spontaneously in a few weeks or months after hospital discharge, but some of the patients become long-term carriers. This raises concerns about the possibilities of community-spread of CPKP and patient-to-patient transmission if a new hospitalisation occurs. In fact, the number of community-onset CPKP infections seems to be increasing in our environment [1].

Long-term colonisation studies have focused primarily on KPC-2-producing *K. pneumoniae* (KP_{KPC}) [2–4] concluding that, in colonised patients, the carrier state may persist for up to 28 months. However, in most cases the monoclonal nature of KP_{KPC} precludes the differentiation between long-term carriage and recolonisation.

In our hospital, KP_{KPC} isolations are uncommon; nonetheless there is a high prevalence of OXA-48-producing *K. pneumoniae* (KpO48). To date, no studies have been made regarding the behavior of KpO48 in outpatients. During the course of a clinical trial we searched for previously colonised patients who had been discharged and remained outside the hospital and investigated their colonisation status as well as the colonising microorganisms.

???

Sample collection

Samples were obtained from twenty-two subjects who met the criteria to be included in the clinical trial “Pilot Study of the Effectiveness of Probiotics and Lactitol for the Decolonisation of OXA-48 (Carbapenemase) Producing *Klebsiella pneumoniae* Among Rectal Carriers (DESPROBIOXA), (NCT02307383)”, to evaluate the effectiveness of lactitol and probiotics to achieve intestinal decolonisation of KP_{OXA-48}. This study was finally stopped due to insufficient recruitment.

Study subjects were non-hospitalised individuals colonized by KpO48 during a previous admission (≥ 1 month before recruitment) who agreed to participate. Exclusion criteria included severe health conditions, diarrhea or antibiotic treatment at the moment of the study among others (Most relevant inclusion and exclusion criteria are referred to in Table I). The study was approved by the IRB.

Isolation and identification of OXA-48-producing strains

The subjects were screened with a rectal swab plated in OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* (OXA-PE) selective medium chromID™ OXA-48 (Biomerieux) and then introduced into a liquid enrichment medium TSB with an ertapenem disk (1 µg/ml) for 18 hours at 37°C. After 18 hours TSB medium was plated on the same agar media and isolates were confirmed to carry the *bla*OXA-48 by specific qPCR (Progenie molecular®). All subjects who tested positive for any OXA-PE in the initial screening were invited to participate in the study and asked to collect a stool sample before initiating treatment. Stool samples were plated using the same method as rectal swabs. All OXA-PE isolated by this method were subsequently analyzed.

Enterobacterial isolates growing on chromogenic agar plates were identified using MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH., Bremen). Isolates belonging to the same species but

showing different morphologies at visual inspection were isolated and conserved at -80C° for further analysis. Antibiotic susceptibility of all isolates was determined by MicroScan® panels and interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standards.

Clonality study

Clonal relatedness between KpO48 isolated during hospitalisation and those isolated from stool samples was studied. If participants had been previously colonised by KP_{OXA-48} belonging to sequence types (ST) 405 or 11 a clone-specific qPCR assay [5] was performed. In participants previously colonised by KpO48 with other sequence types, relatedness between hospital-acquired and long-term colonisation strain was determined by REP-PCR using the DiversiLab® system (bioMérieux®). RAPD was used to study clonality in OXA-48-producing *Escherichia coli* isolates, including those obtained from the same patient that had different morphologies and/or antibiogram.

Results

To evaluate the effectiveness of the use of lactitol and probiotics for intestinal decolonisation of KP_{OXA-48} we carried out the clinical trial “Pilot Study of the Effectiveness of Probiotics and Lactitol for the Decolonisation of OXA-48 (Carbapenemase) Producing *Klebsiella pneumoniae* Among Rectal Carriers (DESPROBIOXA), (NCT02307383)”. Nine hundred and eighteen patient histories were reviewed and twenty-two subjects were found that met the inclusion criteria (Table I) and agreed to participate. We report the colonisation status of these twenty-two study-subjects before starting the use of lactitol plus probiotics.

Fourteen (64%) of the twenty-two tested negative and in eight (36%) of them at least one OXA-48-producing enterobacterial isolate was obtained. The median number of days from the last hospital discharge to screening was significantly larger in the negative subjects (mean:309,range: 218-611) than in the positive ones (mean:173; range: 33-313) (Table II). Other epidemiological data are shown in Table II. No differences between the two groups were observed in epidemiological and clinical variables (age, gender, weight, smoking, hypertension, diabetes, dislipemia, hyperuricemia). Functional status indices were similar among the two groups (Barthel index > 90, Katz index between 0-1), as was the Charlson's comorbidity score (3-5). None of the subjects had antibiotic therapy during the previous month.

Two of the participants carried KpO48 as the unique OXA-48-producing enterobacterial species. In four of them the *bla*OXA-48 gene was found in *K. pneumoniae* and *E. coli*, in another it was detected in *K. oxytoca* and *E. coli*, and, finally, in one subject it was found only in *E. coli*. Some of the subjects carried several different *E. coli* OXA-48-producing strains.

Overall, eighteen different OXA-48-producing enterobacterial isolates were obtained from the eight participants, including 6 *K. pneumoniae*, 11 *E. coli* and 1 *K. oxytoca*.

While all the KpO48 isolated from the 8 study-subjects during their hospitalisation were identified as ESBL producers, three of the six KpO48 isolated in this study were not. These isolates presented the phenotypic pattern associated with the expression of the *bla*OXA-48 gene (resistance to penicillins, cephalothin and ertapenem) plus resistance to other antibiotics such as tobramycin plus quinolones or fosfomycin. One KpO48 isolate had the resistance phenotype associated with the expression of the OXA-48 carbapenemase alone and was susceptible to every other antibiotic tested.

Regarding the 11 OXA-48-producing *E. coli* isolates, 6 had the resistance profiles associated with expression of OXA-48 carbapenemase, and 5 were also resistant to quinolones. The *K. oxytoca* isolate presented the resistance phenotype of OXA-48 expression.

Clone-specific qPCR of the 3 KpO48 isolates obtained from individuals previously colonised by ST11 or ST405 tested negative, indicating that the original strains had been replaced by new ones. In the 3 participants previously colonised by other clones, REP-PCR showed also that the hospital clones had been replaced by new ones. RAPD of the 11 *E. coli* isolates showed that they were not clonally related.

Discussion

We have studied the KpO48 intestinal colonisation status of a series of individuals after leaving hospital and the microorganisms harboring the *bla*OXA-48 gene in those subjects that remained positive. The number of days from discharge was higher in the negative subjects, showing that colonisation status cleared with time, but while the original, hospital-acquired KpO48 strains had been cleared as soon as one month after discharge, the *bla*OXA-48 gene persisted circulating among different enterobacterial strains for up to ten months. In almost all the subjects studied, the plasmid harboring the *bla*OXA-48 gene was found in different isolates of non-multiresistant *Enterobacteriaceae*, mostly *E. coli*, but also *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*, suggesting that the plasmid had been transmitted *in vivo* to some strains from the endogenous microbiota. Similar observations have recently been reported during a KpO48 outbreak [6] and in long-term carriers of KP_{KPC} [7] in which the plasmid dynamics over time included several rearrangements and *in vivo* transmission to other strains and species. Plasmids carrying resistance genes are thought to be a burden for the host cells in the absence of antibiotic pressure, and therefore should be

outcompeted by commensal microbiota. Nonetheless, high transconjugation frequencies might facilitate the diffusion and persistence of the plasmid in the endogenous microbiota, while compensatory evolution might promote persistence of particular clones [8,9].

In spite of the small sample size, the frequency of long-term persistence is high enough to think that it is significant and therefore should be regarded as a major epidemiological problem. The intestinal microbiota of these subjects may be a transient reservoir of OXA-48 carbapenemase genes in the community, allowing transmission to close contacts, incrementing the prevalence of community-onset carbapenemase-producing enterobacterial infections and allowing patient-to-patient transmission in new readmission episodes.

We have not found any factors contributing to the long-term persistence of the plasmids harbouring the *bla*OXA-48 gene, and there is scarce information about it, but our data show that these events are far from negligible and might be important contributors to the epidemiology of the OXA-48 carbapenemase.

Acknowledgements

The trial “Pilot Study of the Effectiveness of Probiotics and Lactitol for the Decolonisation of OXA-48 (Carbapenemase) Producing *Klebsiella pneumoniae* Among Rectal Carriers (DESPROBIOXA), (NCT02307383)” was funded by IdiPAZ. The work was supported by grants PI13/01218 and PI14/01832 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III to J.M. and J.R. P.-P. respectively. Co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”.

Declarations of interest: none

[?][?][?]

[?][?][?]



Table I

Most relevant inclusion and exclusion criteria

Inclusion criteria	Exclusion criteria
<ul style="list-style-type: none"> Adults between 18 and 85 Have signed the informed consent to participate Testing positive for the screening test of EPC-OXA-48 First positive screening for <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 ≥ 6 months 	<ul style="list-style-type: none"> Hospitalisation due to an acute process at the moment of inclusion Use of systemic antibiotics (oral, intramuscular or intravenous) at the moment of inclusion Diarrhea in the two weeks previous to inclusion Hydroelectrolytic disorders that require supplements Suffer from diseases that affect intestinal absorption or alter intestinal transit (eg Cröhn's disease, ulcerative colitis) Taking antisecretory inhibitors, proton pump or anti-H₂

????

???? **Table II**

???? Epidemiological data of studied patients

	Long-term <i>bla</i> OXA-48 carriers (<i>N</i> = 8)	Negative as outpatients (<i>N</i> = 14)
Sex		
Female	3	8
Male	5	6
Age, median (range)	66 (36 – 79)	60 (36 – 71)
Days from hospital discharge, median (range)*	173 (33 – 313)	319 (218 - 611)
Days of hospitalisation during last hospital admission, median (range)	35 (0-371)	14 (7-95)

???? *p=0.0027, unpaired *t* test

????

????

????

????

References

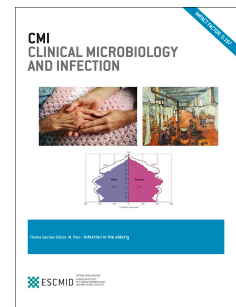
- ???? [1] Paño-Pardo JR, López Quintana B, Lázaro Perona F, Ruiz Carrascoso G, Romero-Gómez MP, Loeches Yagüe B, et al. Community-Onset Bloodstream and Other Infections, Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Epidemiological, Microbiological, and Clinical Features. *Open Forum Infect Dis* 2016;3:ofw136. doi:10.1093/ofid/ofw136.
- ???? [2] Feldman N, Adler A, Molshatzki N, Navon-Venezia S, Khabra E, Cohen D, et al. Gastrointestinal colonisation by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E190–6. doi:10.1111/1469-0691.12099.
- ???? [3] Haverkate MR, Weiner S, Lolans K, Moore NM, Weinstein RA, Bonten MJM, et al. Duration of colonisation with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria at long-term acute care hospitals in Chicago, Illinois. *Open Forum Infect Dis* 2016;3:1–4. doi:10.1093/ofid/ofw178.
- ???? [4] Lübbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers UX, Ducomble T, Eckmanns T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control* 2014;42:376–80. doi:10.1016/j.ajic.2013.12.001.
- ???? [5] López-Camacho E, Rentero Z, Ruiz-Carrascoso G, Wesselink J-J, Pérez-Vázquez M,

- [5] Lusa-Bernal S, et al. Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. Clin Microbiol Infect 2014;20:O891-3. doi:10.1111/1469-0691.12616.
- [6] Göttig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VAJ. In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. Clin Infect Dis 2015;60:1808–15. doi:10.1093/cid/civ191.
- [7] Conlan S, Park M, Deming C, Thomas PJ, Young AC, Coleman H, et al. Plasmid Dynamics in KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae* during Long-Term Patient Colonisation. MBio 2016;7:e00742-16. doi:10.1128/mBio.00742-16.
- [8] Hall JPJ, Brockhurst MA, Dytham C, Harrison E. The evolution of plasmid stability: Are infectious transmission and compensatory evolution competing evolutionary trajectories? Plasmid 2017;91:90–5. doi:10.1016/j.plasmid.2017.04.003.
- [9] Harrison E, Dytham C, Hall JPJ, Guymer D, Spiers AJ, Paterson S, et al. Rapid compensatory evolution promotes the survival of conjugative plasmids. Mob Genet Elements 2016;6:e1179074. doi:10.1080/2159256X.2016.1179074.

Journal Pre-proof

Intestinal loads of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in colonized patients determined from surveillance rectal swabs

Fernando Lázaro-Perona, María Rodríguez-Tejedor, Guillermo Ruiz-Carrascoso, Beatriz Dían-Pollán, Belén Loeches, Juan Carlos Ramos-Ramos, Jesús Mingorance



PII: S1198-743X(20)30608-X

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.054>

Reference: CMI 2274

To appear in: *Clinical Microbiology and Infection*

Received Date: 27 January 2020

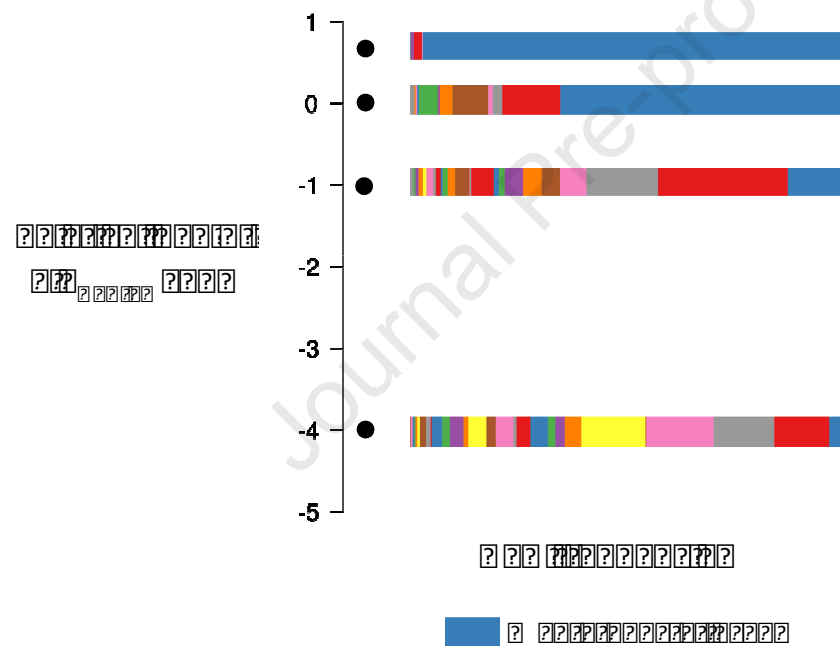
Revised Date: 23 September 2020

Accepted Date: 28 September 2020

Please cite this article as: Lázaro-Perona F, Rodríguez-Tejedor M, Ruiz-Carrascoso G, Dían-Pollán B, Loeches B, Ramos-Ramos JC, Mingorance J, Intestinal loads of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in colonized patients determined from surveillance rectal swabs, *Clinical Microbiology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.054>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Intestinal loads of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in colonized patients determined from surveillance rectal swabs

Fernando Lázaro-Perona¹, María Rodríguez-Tejedor¹, Guillermo Ruiz-Carrascoso¹, Beatriz Dían-Pollán², Belén Loeches², Juan Carlos Ramos-Ramos², Jesús Mingorance^{1*}

¹ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

² Unidad de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

*Address correspondence to: Jesús Mingorance, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. e-mail: jesus.mingorance@idipaz.es, ORCID: 0000-0001-6173-5711.

Running title: Quantification of intestinal KpOXA

Keywords: OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, intestinal colonization, OXA-48, carbapenemases

Abstract

Objectives: To determine quantitatively the extent of intestinal colonization by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* (KpOXA) in hospitalized patients.

Methods: The load of the OXA-48 β -lactamase gene in rectal swabs from 147 colonized patients was measured by quantitative PCR. The load was calculated relative to the total bacterial population (represented by the 16S rRNA gene) using the $\Delta\Delta C_t$ method and pure cultures of OXA-48-producing *K. pneumoniae* as reference samples. The relative loads of the epidemic *K. pneumoniae* clones ST11 and ST405 were also measured.

Results: The relative intestinal loads of the OXA-48 β -lactamase gene, RL_{OXA-48} , in hospitalized patients were high. The median RL_{OXA-48} was -0.42 (CI 95%: -0.60, -0.16), close to that of a pure culture of OXA-48-producing *K. pneumoniae* ($RL_{OXA-48}=0$). In those patients colonized by the KpOXA clones ST11 (51/147, 34.7%) and ST405 (14/147, 9.5%), the relative loads of these clones were similarly high (median $RL_{ST11}=-1.1$, CI 95%: -1.64, -0.92; median $RL_{ST405}=-1.3$, CI 95%: -1.76, -0.96). Patients that had received previous antibiotic treatments and those that developed infections by KpOXA had significantly higher RL_{OXA-48} values: -0.32 (CI 95%: -0.58, -0.20) vs. -1.07 (CI 95%: -2.43, -0.35) and -0.26 (-0.77, -0.23) vs. -0.47 (-0.74, -0.28), respectively.

Conclusions: Colonization by KpOXA in hospital patients involves intestinal loads much higher than the *K. pneumoniae* loads reported in the normal microbiota, reaching levels close to those of pure KpOXA cultures in many cases and largely replacing the host microbiota.

Introduction

The incidence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) infections during hospital admission is increasing worldwide [1] and while some hospitals have reported success in controlling CPE outbreaks[2] others are confronting an endemic situation [3]. Intestinal colonization by CPE is silent, but colonized patients have a higher risk of developing a CPE infection[4,5] and are a source of transmission to other patients[6], for these reasons, recommended control measures include routine screenings for the detection of carriers[7,8].

Gut CPE colonization involves an interaction between the endogenous microbiota and the nosocomial strains competing for the same niche. The risk of colonization increases with conditions that disrupt the microbiota. These include chronic diseases, prolonged hospitalization, close contact with the healthcare system or the use of broad-spectrum antibiotics[9]. These factors may affect the extent to which nosocomial strains displace the endogenous strains and species .

Epidemiological surveillance is done by PCR or culture of rectal swabs in selective media. These assays yield qualitative results (positive/negative), and do not provide information regarding the relative abundances of the resistance genes or the resistant strains. However, the extent of colonization might be an important factor affecting the risk of infection, the spreading of CPE in hospital wards or even the expected time for spontaneous decolonization[6,9,10].

In our hospital, OXA-48-producing *K. pneumoniae* (KpOXA) has become endemic [11–13]. The first isolates detected belonged to the ST405 clone, that was later replaced in part by the epidemic ST11[12,14]. The aims of this work were to investigate the intestinal loads of the OXA-48 gene and OXA-48-producing *K. pneumoniae* in hospitalized patients, to study the factors that might have an effect on these loads, and

their impact on the risk of developing infections by KpOXA or other OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* (OXA-PE).

Methods

Sample collection and DNA extraction

The study included rectal swabs with Amies medium (Deltalab) collected from hospitalized patients as part of the routine KpOXA surveillance protocol from February 2017 to January 2018. This protocol involves the weekly collection of rectal swabs from all the patients in those units in which at least one rectal carrier had been detected before. Two hundred consecutive swabs that yielded positive cultures or were obtained from patients that had at least one previous positive result were included. The swabs are routinely plated in McConkey plus cefotaxime agar plates and incubated for 18 h at 36°C. For this study, the swabs that had already been plated were exhausted in 0.5 ml of TE 1X buffer (Tris-EDTA; 10 Mm Tris, 1Mm EDTA, pH 8.0) and the suspensions were stored at -20 °C until further analysis.

To ensure the complete lysis of the bacterial population, 100 µl of the suspension were mixed with 300 µl of lysis buffer (from Maxwell® 16 LEV Blood DNA kit) and shaken vigorously with silica beads (MoBio) for 10 minutes. Then DNA was extracted using the Maxwell® 16 LEV Blood DNA kit according to the manufacturer protocol and eluted in 100 µl.

Relative quantification of the intestinal load of *bla*_{OXA-48} gene and KpOXA clones

The intestinal loads of the *bla*_{OXA-48} gene and the KpOXA ST11/ST405 clones were measured by qPCR amplification of the target genes and expressed as a proportion in relation to the total bacterial population determined by qPCR as described [15]. The

relative abundances of the targets were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [16]: $\Delta\Delta C_{t_{\text{target}}} = (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{16S}})_{\text{swab}} - (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{16S}})_{\text{KpOXA}}$ where ΔC_t is the difference between the C_t of the target gene and that of the reference gene (16S rRNA gene) [16,17] and $\Delta\Delta C_t$ is the difference between the ΔC_t of a sample (rectal swab) and that of a reference sample (a pure culture of a KpOXA strain). We define the **Relative Load (RL)** of a target gene as $RL = \log(2^{-\Delta\Delta C_t})$. $RL_{\text{OXA-48}}$ values close to zero mean that the microbiota in that sample contains mostly KpOXA while lower values indicate lower degrees of colonization. Values may be higher than zero in strains with a higher copy number of the target gene.

qPCR primers and conditions have been described before [15,18–20]. To avoid qPCR inhibition, DNA from swabs was diluted 10-fold except in case of no detection of the *bla*_{OXA-48} gene or C_t values above the linearity range. In each run, DNA samples from OXA-48-producing *K. pneumoniae* ST11 and ST405 isolates were included as positive controls.

16S rRNA gene microbiome sequencing

The same samples used for qPCR were used for 16S rRNA gene microbiome analysis. The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified, genomic libraries were constructed with the NebNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit (NewEngland), sequenced in an Illumina Miseq® system (2x250 paired-end sequencing), and analyzed with QIIME2 [21].

Clinical records

Electronic clinical records were searched retrospectively. The variables registered were sex, age, co morbidities, hospitalization days, ICU admission, antibiotic treatments in the previous 30 days, treatment with laxatives, and infections. Infections were

considered under two premises: the patient had signs or symptoms of infection and a KpOXA had been isolated from a clinical sample during the current episode of hospitalization (Table 1). The study was approved by the local institutional review board (PI-2578).

Data and statistical analysis

Cts and individual qPCR efficiencies were calculated automatically by the CFX96 Touch™ software. Statistical analysis was performed with SPSS® Statistics 24.0.0.0. For patients having more than one sample, only the data from the first swab were included in the statistical analyses. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values followed an asymmetric distribution, and thus the non-parametric Mann-Whitney U test was used. In four patients (2.7%), the *bla*_{OXA-48} gene qPCR result was negative in spite of having a positive culture. In these, for statistical purposes the $\log(2^{-\Delta\Delta C_t})$ was considered to be one logarithm below the lowest detected value (-5).

Results

Study population

During the study period 200 consecutive rectal swabs positive for KpOXA were collected from 147 hospitalized adult patients (Table 1). Only the first swab of each patient was considered for statistical analyses. Thirty-five (23.8%) patients developed a KpOXA infection during hospitalization. Urinary tract infection was the most frequent (20) followed by respiratory tract infections (7), skin and soft tissue infections (4), abdominal infection (2) and primary bacteremia (2).

Characterization of qPCR reactions

Validation of qPCR reactions was done using serial dilutions of genomic DNA from ST11 and ST405 KpOXA isolates. The linear range of the qPCRs targeting the 16S rRNA gene, *bla*_{OXA-48} gene, and ST11 and ST405 specific markers spanned six ten-fold dilutions ($R^2 \geq 0.99$), ranging from 10^8 to 10^3 cfu/ml and with a limit of detection of 100 cfu/ml. The efficiencies were similar and above 90% for all primer pairs. The calculated $\log(2^{-\Delta\Delta C})$ was independent of DNA dilution in the control strains and in the rectal swabs for all four pairs of qPCR targets.

Intestinal relative load of *bla*_{OXA-48} gene in colonized patients

The RL_{OXA-48} was determined using total DNA obtained from the rectal swabs. For a pure culture of OXA-48-producing *K. pneumoniae* $RL_{OXA-48}=0$. The RL_{OXA-48} of the swabs from colonized patients ranged from -5 to 0.68 with a median of -0.42 (CI 95%: -0.60, -0.16; Fig. 1). In thirty-four patients (23.13%), the RL_{OXA-48} was > 0 , likely due to increased *bla*_{OXA-48} gene or plasmid copy numbers. The relative loads of the chromosomal ST11/ST405 clone-specific markers were in all cases lower than zero.

The RL_{OXA-48} was independent of sex, age, hospitalization days or admission in the ICU. Patients that had had previous positive rectal swabs presented in average higher loads (median $RL_{OXA-48}=0.04$; Range= -2.28 to 0.63) than patients in which the analyzed swab was their first positive sample (median $RL_{OXA-48}= -0.65$; Range= -5 to 0.41) ($p<0.0001$). Health conditions such as immunodeficiency, or the use of chemotherapy or laxatives did not affect the RL_{OXA-48} while patients with Diabetes Mellitus had lower RL_{OXA-48} ($p=0.035$).

Patients that had been treated with any antibiotic or combination of antibiotics in the previous month had a higher RL_{OXA-48} than those that had not been exposed to

antibiotics ($p=0.029$). This is observed also when considering those antibiotic regimens that did not include betalactams ($p=0.005$) or those that included at least a carbapenem ($p=0.009$), but not in those exposed to non-carbapenem betalactams ($p=0.267$). Patients with antibiotic regimens that include carbapenems had higher RL_{OXA-48} than those with regimens that did not include them ($p=0.049$). The patients that developed a hospital infection by KpOXA in the same episode of hospitalization had in average, higher RL_{OXA-48} than those that did not have infections by KpOXA ($p=0.021$).

In 36 patients that had prolonged hospitalization or multiple admissions, we could recover at least two consecutive swabs. Regardless of the lapse between samples (1-244 days) the majority of these patients ($n=29$) maintained a stable RL_{OXA-48} during the follow-up (variation < 1 log unit). In three patients the RL_{OXA-48} increased significantly over time while in four patients the RL_{OXA-48} decreased (Supp. Fig. 1).

Relative loads of the ST11 and ST405 KpOXA clones

Among the 147 patients, 51 (34.7%) were colonized by *K. pneumoniae* sequence type ST11, 14 (9.5%) by ST405 and 82 (55.8%) by other sequence types. There were no significant differences in the RL_{OXA-48} between patients colonized by epidemic (ST11 and ST405) and non-epidemic clones ($p=0.055$) or between the ST11 and the ST405 ($p=0.483$) but patients colonized by the ST11 tended to have a higher RL_{OXA-48} than those colonized by non-ST11 ($p=0.041$).

There were no differences in the RL_{ST11} and the RL_{ST405} ($p=0.466$) but the KpOXA ST11 and ST405 clones had a different response in relation to previous carbapenem exposure. The RL_{ST11} were independent of previous carbapenem exposure ($p=0.424$), but the RL_{ST405} were significantly higher in those patients previously treated with

carbapenems ($p=0.008$). The same effect was observable when considering the RL_{OXA-48} of patients colonized by ST11 ($p=0.054$) or ST405 ($p=0.045$).

The relations between the RL_{OXA-48} and the $RL_{ST11/405}$ were studied in patients colonized by these epidemic clones. There was a linear relation between the OXA-48 load and the specific clone load (Fig. 2) ($R^2= 0.422$, $p<0.001$), though there were two different subpopulations showing deviations that suggest plasmid loss (high $RL_{ST11/405}$, low RL_{OXA-48}) and plasmid transfer to other strains or species (low $RL_{ST11/405}$, high RL_{OXA-48}).

In agreement with this, in some of the patients in which we could do follow-up we observed the RL_{OXA-48} decreasing during hospitalization while the epidemic clone RL was stably maintained indicating overgrowth of the plasmid-less strain (Supp. Fig. 2). In other patients, on the contrary, RL_{OXA-48} increased while the epidemic clone did not, suggesting plasmid transfer to other clones or species and clone displacement.

16S rRNA gene microbiome sequencing

To obtain a direct image of the microbiota displacement, 16S rRNA gene metagenomic analysis was done in rectal swabs samples from four patients selected to cover a broad range of RL_{OXA-48} values (from -4.0 to 0.7). The results showed a direct relation between the RL_{OXA-48} values and the fraction of reads belonging to the *Enterobacteriaceae* (Fig. 3). The patient with the highest RL_{OXA-48} presented very low microbiome diversity (Shannon diversity 2.8), dominated by the *Enterobacteriaceae* family (>95% of the reads). On the other side, in the patient with the lowest RL_{OXA-48} value the *Enterobacteriaceae* family represented a small fraction (<5% of the reads), and the microbiome contained representatives of several families (Shannon diversity 6.4).

Discussion

The large population size of the intestinal microbiota[22] means that the potential range of variation of the intestinal loads of specific strains or species is very broad, and this may have major impacts on the risks of infection of the colonized patient, transmission to other patients or environmental spread [6,23].

Hospital surveillance studies are commonly done collecting rectal swabs, better suited for screening purposes than fecal samples. We have used the rectal swabs to measure the relative amounts of target genes by qPCR by normalizing with the 16S rRNA gene as a measure of the total bacterial population [15,24]. With this approach we have studied the intestinal loads of the *bla*_{OXA-48} gene and two epidemic KpOXA clones in hospitalized patients and have found that their relative loads span a broad range (five log units), and that a large fraction of these patients had very high relative loads, close to those of a pure culture of KpOXA and much higher than those reported in the normal microbiota[25,26]. This was found when targeting either the plasmidic *bla*_{OXA-48} gene or the chromosomal ST11/ST405 clone-specific markers. The values of the *bla*_{OXA-48} gene were more dispersed than those of the clone markers, and there were even values higher than zero, probably reflecting variability in the *bla*_{OXA-48} plasmid copy number, though the overall pattern was essentially the same with the plasmid and the chromosomal markers (Fig. 2).

The patients with the highest loads had altered microbiomes composed almost entirely by *Enterobacteriaceae*, most likely a single KpOXA strain. These might be the largest KpOXA reservoirs within the hospital, and the huge amounts of KpOXA carried by these patients might contribute to the successful spread of these clones and the difficulties to control these outbreaks in spite of the considerable efforts done.

???? We found significant positive associations between the loads of the *bla*_{OXA-48} gene and
???? antibiotic use. These associations result from the disruption of the intestinal microbiota
???? produced by the antibiotics [27,28] and the selection of multidrug resistant bacteria. A
???? significant association was found for carbapenem use but not for the group of non-
???? carbapenem betalactams. It should be noted that this is a heterogeneous group that
???? includes betalactams, betalactams with betalactamase inhibitors, cephalosporins of all
???? generations and short course preoperative surgical antibiotic prophylaxis.

???? Diabetic patients tended to have lower loads, a protective effect that might be related to
???? the effects of metformin treatments on the gut microbiota and the gut epithelium [29].
???? On the other hand, infections during the same hospitalization episode than the swab
???? collection were associated to higher loads of the *bla*_{OXA-48} gene in ST11 KpOXA,
???? suggesting a direct relation between the intestinal load of this clone and the risk of
???? infection.

???? The relative quantification method could be used to monitor the gene loads. This showed
???? that intestinal loads of KpOXA were stable in hospitalized patients on the short term,
???? and also that colonization is gradual, as shown by the higher KpOXA levels of those
???? patients that had previous positive swabs compared with those that were positive for the
???? first time. The association between OXA-48 gene loads and the clone-specific target
???? loads was also stable, though, in some cases, the loads diverged, pointing to plasmid
???? transfer or loss events and reflecting the dynamics of the carbapenemase-harboring
???? plasmids and the enterobacterial populations.

???? A limitation of the method is the uncertainty in the actual copy numbers per cell of the
???? gene markers, though this might be improved by combining the data with 16S
???? metagenomic analysis of the gut microbiome composition. Indeed, the method
???? presented in this work is complementary to the 16S metagenomics, but while the later

provides an image of the whole bacterial population, the qPCR method can be easily directed to any specific target gene down to the clone or single gene level. The combination of the two methods might be helpful to monitor the impact of interventions on the patient microbiota, and specific genes and clones.

Conflict of interests

The authors report no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, [PI16/01209 to J.M.]. Co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe".

Authors' contributions

FL-P, MR-T and GR-C selected and collected the samples. FL-P and MR-T carried out the DNA extractions and qPCR assays. GR-C, BD-P, BL and JCR-R participated in the study design and collected the patient data from clinical records. FL-P participated in the design of the study and performed the statistical analysis. JM conceived of the study, participated in its design and coordination and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a

- population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019;19:56–66.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4).
- [2] Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, Kraker ME De, Zee A Van Der, Burgh S Van. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA- 48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands , 2009 to 2011 2014;1–12.
- [3] David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>.
- [4] Gorrie CL, Mir M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients 2018;65. <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>.
- [5] Freedberg DE, Zhou MJ, Cohen ME, Annavajhala MK, Khan S, Moscoso DI, et al. Pathogen colonization of the gastrointestinal microbiome at intensive care unit admission and risk for subsequent death or infection. *Intensive Care Med* 2018;44:1203–11. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5268-8>.
- [6] Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:470.e1-470.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.015>.
- [7] World Health Organization. Guidelines for the Prevention and Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Health Care Facilities. 2017.
- [8] Cohen MJ, Block C, Levin PD, Schwartz C, Gross I, Weiss Y, et al. Institutional control measures to curtail the epidemic spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a 4-year perspective. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:673–8. <https://doi.org/10.1086/660358>.
- [9] van Loon K, Voor in 't holt AF, Vos MC. A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob*

- Agents Chemother 2017;62:1–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01730-17>.
- [10] Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis 2012;55:905–14. <https://doi.org/10.1093/cid/cis580>.
- [11] Herruzo R, Ruiz G, Perez-Blanco V, Gallego S, Mora E, Vizcaino MJ, et al. Bla-OXA48 gene microorganisms outbreak, in a tertiary Children's Hospital, Over 3 years (2012–2014). Medicine (Baltimore) 2017;96:e7665. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007665>.
- [12] Pérez-Blanco V, Redondo-Bravo L, Ruiz-Carrascoso G, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Robustillo-Rodela A, et al. Epidemiology and control measures of an OXA-48-producing Enterobacteriaceae hospital-wide oligoclonal outbreak. Epidemiol Infect 2018;146:656–62. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000249>.
- [13] Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, et al. Infections caused by OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. J Antimicrob Chemother 2013;68:89–96. <https://doi.org/10.1093/jac/dks364>.
- [14] Paño-Pardo JR, Quintana BL, Perona FL, Carrascoso GR, Romero-Gómez MP, Yagüe BL, et al. Community-onset bloodstream and other infections, caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Epidemiological, microbiological, and clinical features. Open Forum Infect Dis 2016;3:1–7. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw136>.
- [15] Ramos-Ramos JC, Lázaro-Perona F, Arribas JR, García-Rodríguez J, Mingorance J, Ruiz-Carrascoso G, et al. Proof-of-concept trial of the combination of lactitol with Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus for the eradication of intestinal OXA-48-producing Enterobacteriaceae. Gut Pathog 2020;12:1–8. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00354-9>.
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402–8.

- https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.
- [17] Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 2004;5:3. https://doi.org/10.1186/1471-2172-5-3.
- [18] López-Camacho E, Rentero Z, Ruiz-Carrascoso G, Wesselink J-J, Pérez-Vázquez M, Lusa-Bernal S, et al. Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O891–3. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12616.
- [19] Swayne RL, Ludlam H a, Shet VG, Woodford N, Curran MD. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:35–8. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.010.
- [20] Yang S, Lin S, Kelen GD et al. Quantitative multiprobe PCR assay for the simultaneous detection and species identification of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3449–54. *J Clin Microbiol* 2002;40:3449–54. https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3449.
- [21] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019;37:852–7. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9.
- [22] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 2016;164:337–40. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013.
- [23] Shimasaki T, Seekatz A, Bassis C, Rhee Y, Yelin RD, Fogg L, et al. Increased Relative Abundance of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* Within the Gut Microbiota Is Associated With Risk of Bloodstream Infection in Long-term Acute Care Hospital Patients. *Clin Infect Dis* 2019;68:2053–9. https://doi.org/10.1093/cid/ciy796.
- [24] Lerner a, Romano J, Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y, et al. Rectal

- swabs are suitable for quantifying the carriage load of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1474–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-12>.
- [25] Leclerc H, Mossel DAA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the Bacteriology of the Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:201–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.201>.
- [26] FINEGOLD SM, SUTTER VL, MATHISEN GE. Normal Indigenous Intestinal Flora. ACADEMIC PRESS, INC.; 1983. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-341280-5.50007-0>.
- [27] Zimmermann P, Curtis N. The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota. *J Infect* 2019;29:541–4. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.10.008>.
- [28] Pallegà A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* 2018. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9>.
- [29] Ducarmon QR, Zwiittink RD, Hornung BVH, van Schaik W, Young VB, Kuijper EJ. Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. *Microbiol Mol Biol Rev* 2019;83:1–29. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00007-19>.

Table 1. Univariate analyses for demographic and clinical variables and their associations with the intestinal *bla*_{OXA-48} gene loads (RL_{OXA-48}).

Variables		n	RL _{OXA-48} Median (CI 95%)	Effect size, r	p value*
Sex	Male	79	-0.47 (-0.74, -0.24)	0.02	0.488
	Female	68	-0.34 (-0.77, -0.16)		
Age, median [range]			76 [30 – 98]		0.638
Hospitalization days, median [range]			18 [0 – 425]		0.228
Hospitalized in ICU	Yes	61	-0.29 (-0.75, -0.11)	0.09	0.257
	No	86	-0.47 (-0.70, -0.28)		
Previous positive swab	Yes	26	0.08 (-0.03, 0.19)	0.41	p<0.001
	No	121	-0.60 (-0.83, -0.36)		
Chronic diseases					
Diabetes mellitus	Yes	34	-0.71 (-1.06, -0.20)	0.13	0.035
	No	113	-0.32 (-0.60, -0.16)		
Immunodeficiency	Yes	36	-0.19 (-0.91, -0.11)	0.03	0.558
	No	111	-0.48 (-0.74, -0.28)		
Active treatments					
Chemotherapy	Yes	15	-0.20 (-0.79, 0.00)	0.04	0.538
	No	132	-0.45 (-0.70, -0.28)		
Laxatives	Yes	54	-0.40 (-0.77, -0.17)	0.04	0.335
	No	93	-0.48 (-0.75, -0.20)		
Antibiotic regimens that include:					
Any antibiotic ¹		132	-0.32 (-0.58, -0.20)	0.18	0.020

Only non-betalactam antibiotics ¹		15	-0.20 (-0.50, -0.05)	0.23	0.005
Betalactam non-carbapenem ¹		61	-0.64 (-1.21, -0.40)	0.01	0.291
Carbapenems	Yes	56	-0.20 (-0.41, -0.10)	0.20	0.009
	No	91	-0.60 (-0.91, -0.35)		
OXAKP Infection	Yes	35	-0.26 (-0.77, -0.23)	0.16	0.049
	No	112	-0.47 (-0.74, -0.28)		

????

????

???? *Mann-Whitney test, except the continuous variables (age, hospitalization days) that were analyzed by Pearson correlation test.

???? ¹During the 30 days before sampling compared to a control group non exposed to antibiotics (n=15) Median (CI 95%): -1.07 (-2.42, -0.35).

????

????

Figure Legends

Figure 1. Relative intestinal Loads of the *bla*OXA-48 gene (RL_{OXA-48}) in 147 patients colonized by OXA-48 producing *K. pneumoniae*. The box plot shows the distribution of RL_{OXA-48} values. The box spans data between the first (-1.33) and third (-0.02) quartiles. The horizontal line inside the box is the median value (-0.41). The RL_{OXA-48} values were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using a pure culture of OXA-48 producing *K. pneumoniae* as reference. Values higher than zero may be due to increased *bla*OXA-48 gene or plasmid copy numbers.

Figure 2. Correlation between the RL_{OXA-48} and $RL_{ST11/405}$ in patients colonized by the epidemic clones. In most patients the loads of the carbapenemase gene and the clone-specific markers were linearly correlated (group A), though a small group of patients (group B) had RL_{OXA-48} higher than that of the epidemic clone, and another group (group C) had lower RL_{OXA-48} values.

Figure 3. 16S rRNA gene metagenomic sequencing of the microbiota of four samples with representative RL_{OXA-48} values. The patients with higher RL_{OXA-48} had increased representation of the *Enterobacteriaceae* family and lower microbiome complexity. The Shannon diversity values of these four samples are from left to right: 2.8, 3.9, 6.2 and 6.4.

????

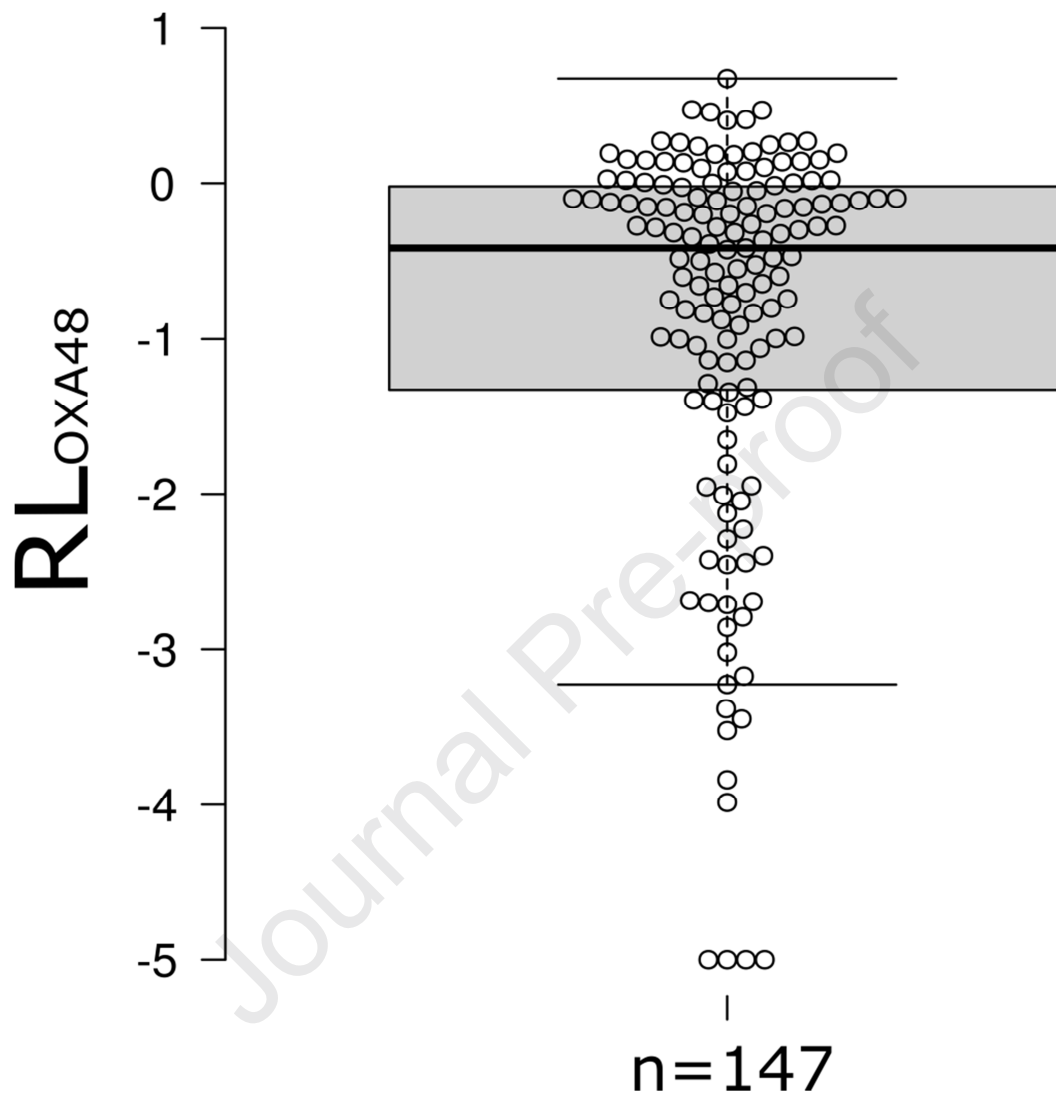
????

???? **Supp. Figure 1.** Follow-up of the RL_{OXA-48} in four representative patients. In most of the patients studied the RL_{OXA-48} presented scarce variations between consecutive rectal swabs (Figures 2A-B), but some of them showed increases (2C) or decreases (2D) above one log unit in their RL_{OXA-48} during the admission.

???? **Supp. Figure 2.** Dynamic evolution of the RL_{OXA-48} and the RL_{ST11} in colonized patients. In the patient shown in panel (A) both markers, the epidemic clone and the *blaOXA-48* gene decreased. In the patient shown in panel (B) the *blaOXA-48* gene must have been carried by more than one clone at time zero, but after 121 days the epidemic clone becomes dominant and the relative loads converge. The patient shown in panel (C) had high and stable relative loads of the two markers during 244 days. The patient in panel (D) presented a rapid reduction of the RL of the epidemic clone while increasing the *blaOXA-48* gene.

????

Figure 1



????

????

????

????

????

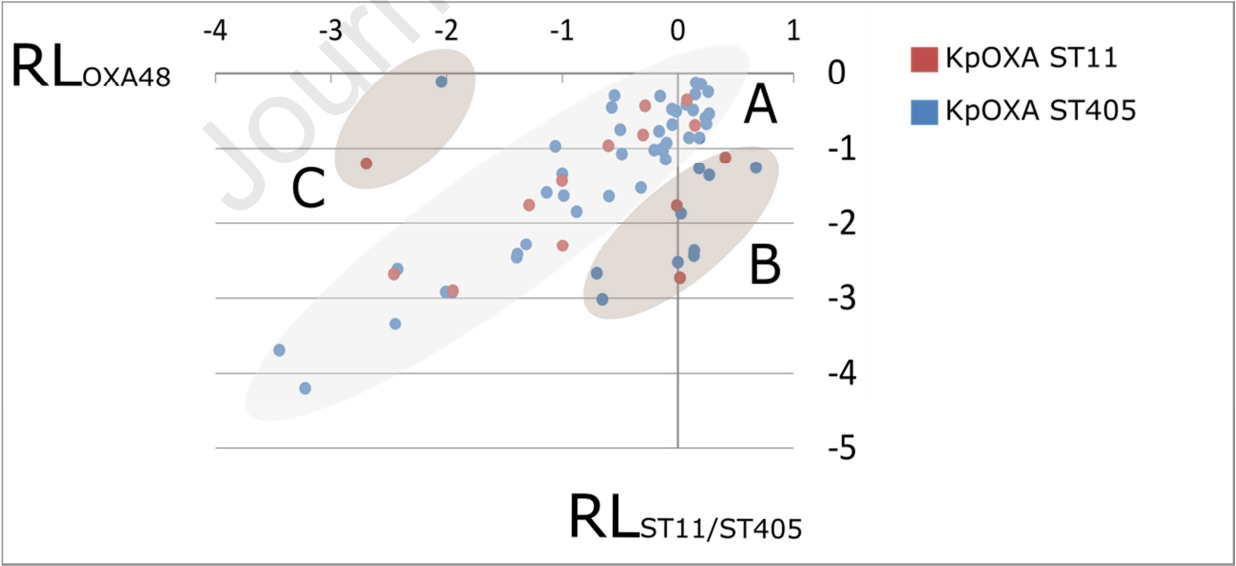
????

???? **Figure 2.**

????

????

????



????

????

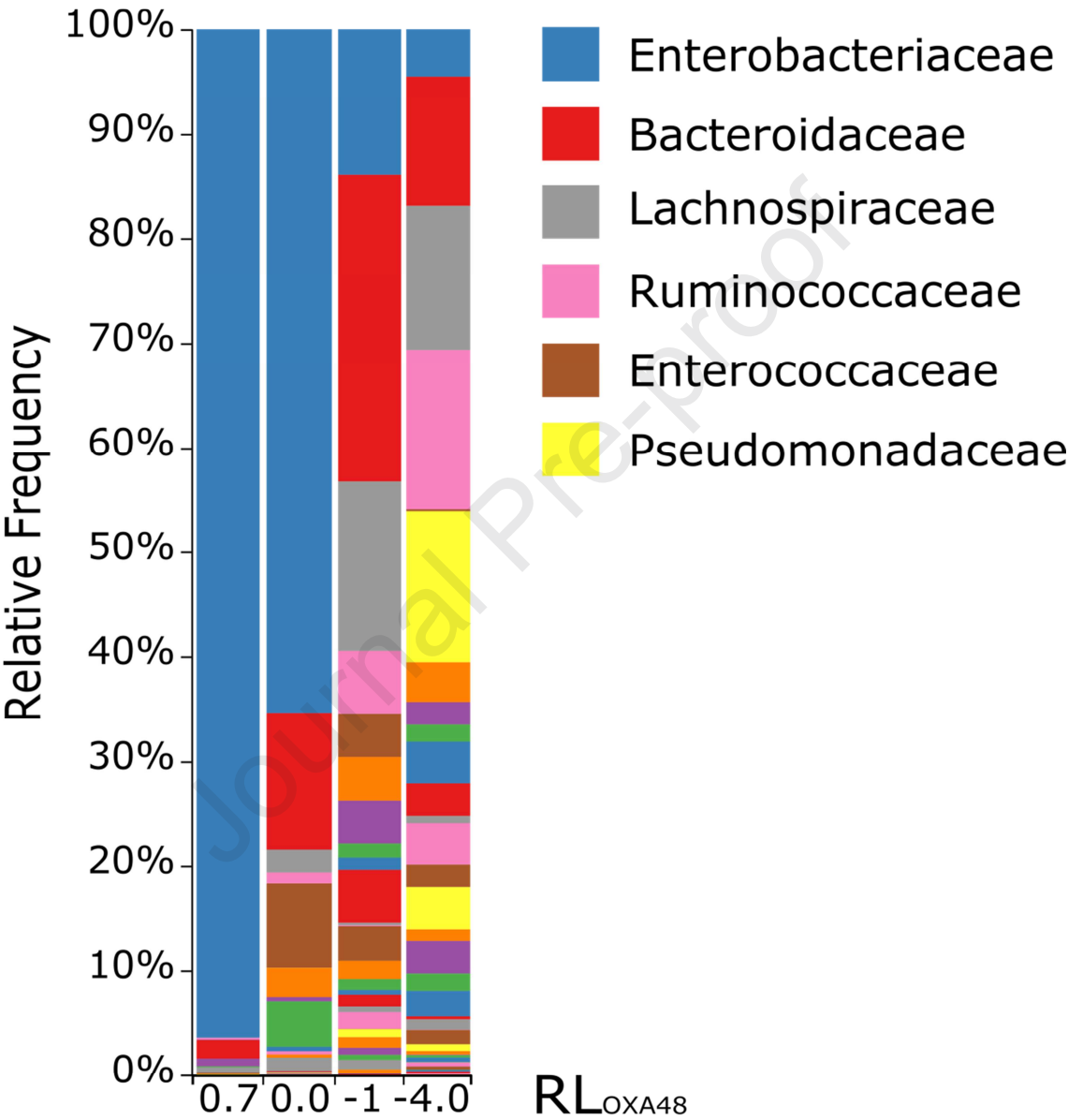
????

????

????

???? **Figure 3.**

????



????

????

????

????

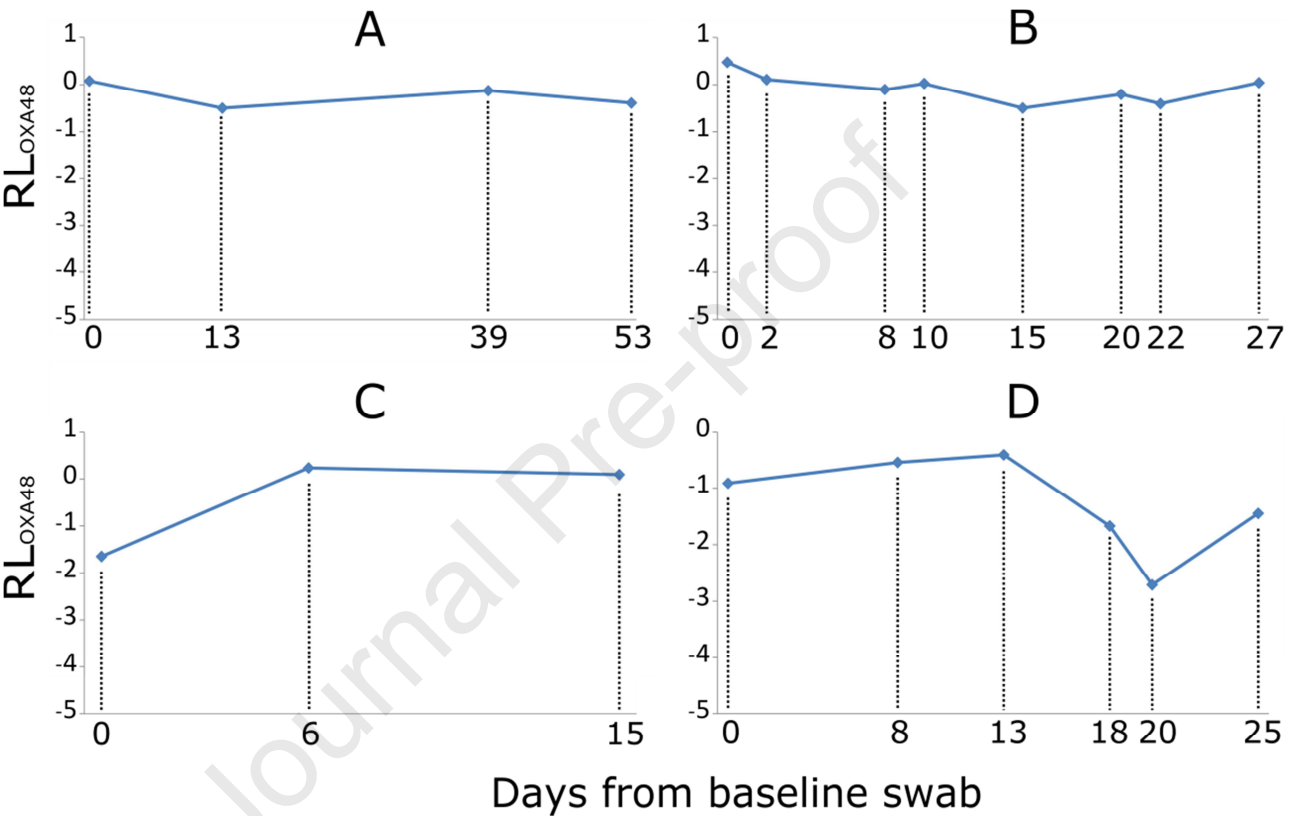
????

????

???? Supp. Figure 1.

????

????



????

????

????

????

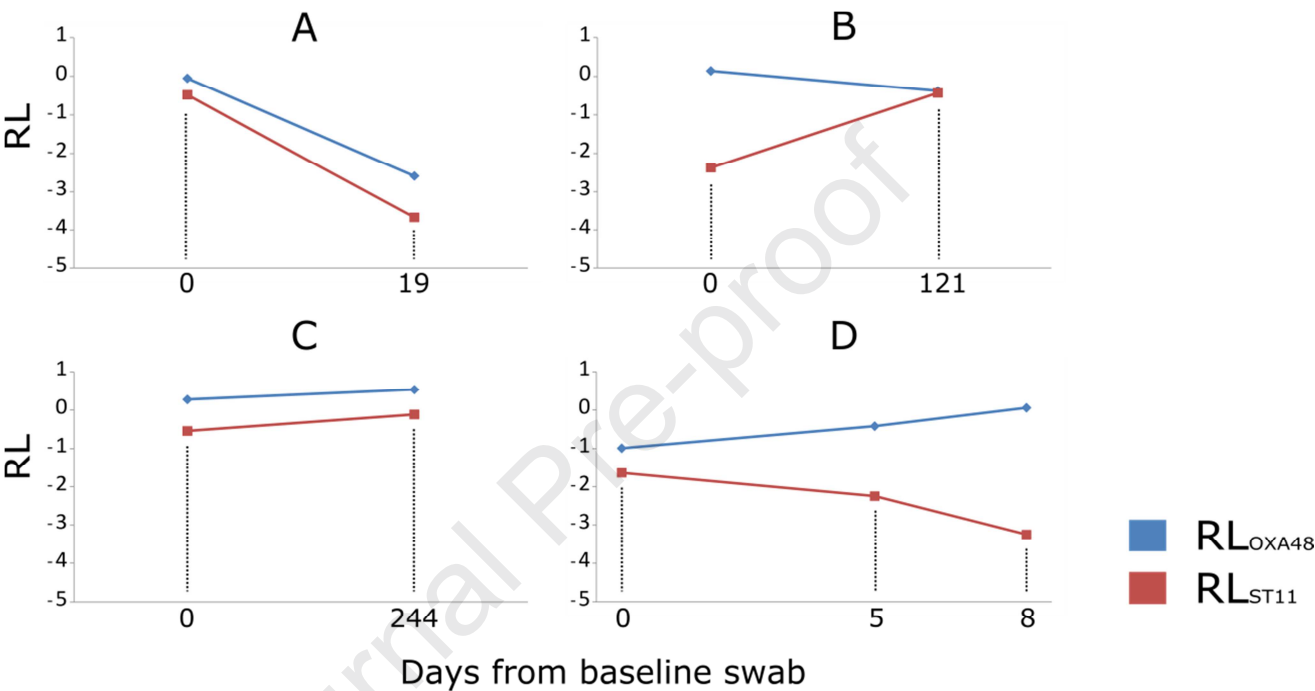
????

????

????

????

Supp. Figure 2.



RESEARCH ARTICLE

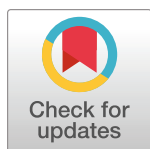
Influence of a *Serratia marcescens* outbreak on the gut microbiota establishment process in low-weight preterm neonates

Esperanza Escribano¹✉, Claudia Saralegui²✉, Laura Moles^{2,3}, María Teresa Montes¹, Claudio Alba⁴, Teresa Alarcón⁴, Fernando Lázaro-Perona⁵, Juan Miguel Rodríguez³, Miguel Sáenz de Pipaón^{1,6}, Rosa del Campo^{1,6}✉*

1 Servicio de Neonatología, Hospital Universitario La Paz, and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **2** Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid, Spain, **3** Departamento de Bromatología, Facultad de Veterinaria Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **4** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Princesa, and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **5** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, **6** Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

* rosacampo@yahoo.com



OPEN ACCESS

Citation: Escribano E, Saralegui C, Moles L, Montes MT, Alba C, Alarcón T, et al. (2019) Influence of a *Serratia marcescens* outbreak on the gut microbiota establishment process in low-weight preterm neonates. PLoS ONE 14(5): e0216581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581>

Editor: Anatoly V. Grishin, Children's Hospital Los Angeles, UNITED STATES

Received: November 10, 2018

Accepted: April 25, 2019

Published: May 21, 2019

Copyright: © 2019 Escribano et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The clinical data have been uploaded as a Supporting Information file. Additionally, the genome sequences are deposited in the European Nucleotide Archive database with the accession numbers QYRU00000000 and QYSA00000000 for Clone A (submission numbers SUB4493714 and SUB4514092); and QYRV00000000 and QYSB00000000 for Clone B (submission numbers SUB4510090 and SUB4525283). Fasta files are deposited in the NCBI

Abstract

Adequate gut microbiota establishment is important for lifelong health. The aim was to sequentially analyze the gut microbiota establishment in low-birth-weight preterm neonates admitted to a single neonatal intensive care unit during their first 3 weeks of life, comparing two epidemiological scenarios. Seven control infants were recruited, and another 12 during a severe *S. marcescens* outbreak. Meconium and feces from days 7, 14, and 21 of life were collected. Gut microbiota composition was determined by 16S rDNA massive sequencing. Cultivable isolates were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis, with four *S. marcescens* submitted for whole-genome sequencing. The expected bacterial ecosystem expansion after birth is delayed, possibly related to antibiotic exposure. The *Proteobacteria* phylum dominates, although with marked interindividual variability. The outbreak group considerably differed from the control group, with higher densities of *Escherichia coli* and *Serratia* to the detriment of *Enterococcus* and other *Firmicutes*. Curiously, obligate predators were only detected in meconium and at very low concentrations. Genotyping of cultivable bacteria demonstrated the high bacterial horizontal transmission rate that was confirmed with whole-genome sequencing for *S. marcescens*. Preterm infants admitted at NICU are initially colonized by homogeneous microbial communities, most of them from the nosocomial environment, which subsequently evolve according to the individual conditions. Our results demonstrate the hospital epidemiology pressure, particularly during outbreak situations, on the gut microbiota establishing process.

web site under the Bioproject PRJNA510235 reference.

Funding: Claudio Alba was supported by “Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid” and European Social Funds. Claudia Saralegui was supported by “Fundación Mutua Madrileña” grant to Rosa del Campo achieved in 2017 call with reference number AP165902017.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The relationship between our human cells and the microbial communities living inside us can be classified as mutualistic, commensal, or pathogenic. This consideration delimits the fine barrier that distinguishes colonization from infection, and can fluctuate over time due to influence from the host or from microbial and environmental factors. The influence of the intestinal microbiota on global human health has been confirmed [1–3], forming new research perspectives aimed to optimize the composition and the functionality of this bionetwork.

Adequate microbiota establishment in newborns is a process particularly relevant for their lifelong health [4], and its management represents a scientific challenge. Human bacterial colonization might start *in utero*, but the critical step begins with the exposure to maternal bacteria at birth and during the early postnatal period [5–6]. Bacterial populations fluctuate considerably during the first months of life, until a stable ecosystem is established when the infant is approximately 2–3 years of age [7–8]. Universal criteria defining a “normal” or “healthy” gut microbiota have not yet been established, which should be characterized by a high diversity, marked inter-individual variability, and conserved intraindividual stability. However, the composition of this ecosystem is influenced by numerous factors [9–10], such as the gestational age at which the neonate is born [11–12].

Preterm birth is the main cause of perinatal morbidity and mortality, as well as an important risk factor for death in the first 5 years of life [13]. A considerable increase in preterm birth rates over the past two decades has been reported worldwide, in both developed and developing countries [14]. In Spain, the preterm birth rate of all live births increased from 7.1% in 1996 to 8.2% in 2008, which is one of the highest rates in Europe [15]. This global tendency can be explained by several factors, including an early or advanced mother’s age, a small gap between pregnancies, low body mass index, multiple pregnancy, history of infectious diseases, stress, alcohol consumption, and periodontal disease [13]. Nevertheless, approximately half of the spontaneous preterm births have an unidentified cause, and it has been suggested that the composition of the maternal microbiota could play a relevant triggering role [7,16].

In low-birth-weight preterm infants (<2500 g), the gut microbiota composition and their biodiversity are aberrant, given the bacterial establishment is delayed by their prolonged hospital stay and their intense exposure to antimicrobials [12,17–19]. This fact explains, at least partially, why preterm infants have a very immature immune system and typically experience infectious complications [20–22]. In this context, *Serratia marcescens* is one of the most relevant emerging pathogens causing severe outbreaks in this population [23–24]. Pathogenic gut colonization during nosocomial outbreaks has frequently been reported; to our knowledge, however, the influence of an outbreak on the microbiota establishment process has not thus far been studied.

The aim of the present study was to sequentially analyze the gut microbiota establishment of low-birth-weight preterm neonates admitted to a single neonatal intensive care unit (NICU) during their first 3 weeks of life, comparing two epidemiological scenarios: a normal period and a period with a nosocomial *S. marcescens* outbreak.

Materials and methods

Preterm neonate inclusion criteria and sampling procedure

La Paz University Hospital (Madrid, Spain) has a 23-bed level III NICU, from which 19 low-birth-weight preterm neonates (<32 weeks gestational age) were recruited in two separate periods: (A) during an epidemiologically normal period in 2015 (control group, $n = 7$); and (B) during a severe *S. marcescens* outbreak from December 2016 to March 2017 (outbreak

group, $n = 12$). Despite the different sampling periods, there were no significant changes in the NICU. It is important to note the data lack in the control group about antibiotic consumption, and clinical data, as a limitation of our work. From each preterm infant, four fecal samples were collected after birth: meconium, and feces from 7, 14, and 21 days of life. Although our initial aim was to extend the recruitment period, logistical limitations limited the study to the first three weeks. The samples were directly recovered from the diaper using a sterile plastic stick and immediately stored at -80°C . Although our intention was to collect fecal samples immediately after deposition, we cannot rule out the possible contact and contamination with urine. However, the contribution of the urinary microbiota should be insignificant.

For the control group, only DNA from fecal samples was available, whereas for the outbreak group bacterial growth was obtained by culture-dependent techniques in addition to DNA. The ethics committee “Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universiatrio La Paz” approved the study (reference HULP3551), and the data of all the neonates were obtained from their clinical chart. The infants were categorized according to four variables: 1) epidemiological situation (normal or *S. marcescens* outbreak); 2) delivery mode (vaginal or C-section); 3) gestational age (extremely preterm: <28 weeks; very preterm: 28–30 weeks; or moderately preterm: 30–32 weeks); and 4) birth weight (<1000 g; 1000–1500 g; or >1500 g).

Sample processing

Fecal samples from the *S. marcescens* outbreak group were slowly defrosted at -20°C for 24 h and 4°C for another 24 h, in order to avoid bacterial death. Portions between 0.3–0.5 g of each sample were inoculated into Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco, Detroit, Michigan) and incubated at 37°C for 24 h as a bacterial pre-enrichment. Cultivable bacteria were isolated in selective and nonselective agar media from the BHI tube, including agar plates of M-*Enterococcus*; De Man, Rogosa and Sharpe (MRS); mannitol salt; McConkey; and Columbia, with 5% sheep blood. The culture media were purchased from Difco, and the plates were incubated at 37°C for 24–48 h, including 5% CO_2 for the blood agar plates, and anaerobic conditions for the MRS plates. Colony identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (Bruker, Germany), and all the isolates were conserved at -80°C in semi-skimmed milk. In parallel to bacterial cultures, total DNA was obtained from fecal aliquots of 0.3–0.5 g with the QiaAMP kit (Qiagen, Germany), determining their concentration and quality by Qubit fluorometer (Invitrogen, USA).

16S rDNA next-generation sequencing

The fecal DNA samples were sent to FISABIO (Valencia, Spain) for massive Mi-Seq 2×300 bp paired-end Illumina 16S rDNA sequencing (Cod. 15044223 Rev. A) from the V3 and V4 regions, which were amplified with the following primers: (Forward Primer: 5' –TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG), (Reverse Primer: 5' –GTC TCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVG GGTATCTAATCC) [25]. Shannon and Chao1 indexes were used for alpha bacterial diversity estimation and were calculated, eliminating taxa with fewer than three lectures. Taxonomic affiliations were assigned using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier, and reads with an RDP score below 0.8 were assigned to the upper taxonomic rank, leaving the last rank as unidentified. Sequence quality was measured according to the following parameters: minimum length, 250 bp; trimming quality measure type, mean; trimming quality number from 3' extreme, 30; trimming quality window, 10 bp. Relative abundance and contingency tables included singletons and very low-represented taxons. The statistical analysis was performed using R statistical software and several open source libraries. The quantitative data of the reads were homogenized using their

relative percentage from the total reads of each sample to facilitate the comparison between samples. Finally, the Galaxy Huttenhower Platform (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>) was used in order to calculate the Linear Discriminant Effect Size Analysis (LEfSe) algorithm and to obtain cladograms in which microbial taxa that explain significant differences among groups of samples were represented. A free software platform was used according to paper instructions [26]. For the statistical analysis, samples with fewer than 1,000 reads were dismissed, and all the samples from patient 7B were excluded due to a lack of some demographic and perinatal information. Fasta files are deposited in the NCBI web site under the Bioproject PRJNA510235 reference.

Pulse-field gel electrophoresis typing

Cultivable bacterial isolates were genotyped by pulse-field gel electrophoresis (PFGE), using the habitual particular settings for the PFGE protocol and also for the restriction enzymes (*Sma*I for staphylococci and enterococci, *Xba*I for *Escherichia coli*, and finally *Spe*I for *Serratia* and *Klebsiella*). The PFGE pattern analysis was made with Phoretix 5.0 software (TotalLab, Newcastle upon Tyne, UK), and the representation of the results was made based on Dice coefficients and the unweighted pair group method with arithmetic mean algorithm.

Whole genome sequencing

Four *S. marcescens* isolates from different infants were submitted to whole genome sequencing (WGS) by MiSeq technology (Illumina), and the genetic relationships were analyzed in the Galaxy Huttenhower Platform. The genome sequences are deposited in the European Nucleotide Archive database with the accession numbers QYRU000000000 and QYSA000000000 for Clone A, and QYRV000000000 and QYSB000000000 for Clone B.

Fungi identification

The internal transcribed spacer (ITS)-1 region was amplified from the total fecal DNA using polymerase chain reaction (PCR) in order to analyze fungi diversity, using the primers ITS1-F (5' -CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGG GCGGGGGCACGGGGGGCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS1-R (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [27]. Afterward, the amplicons were separated with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), using the D-CODE system (BioRad Laboratories, USA). The gel bands were cut, reamplified, and sequenced in an AQBI Prism 7000 apparatus.

Statistical analysis

The Kruskal-Wallis index was used for differences between two groups of samples (comparing medians) for each variable of study, and Dunn's test was used when more than two groups were defined regarding a variable of study. The principal component analysis was applied for the multivariate analysis regarding taxonomical data in order to see differences between groups according to the variables of study. Statistical significance was adjusted to $p < .005$.

Results

Characteristics of the preterm infants

The demographic and clinical characteristics of both newborn groups are shown in Table 1 and in S1 Dataset. The most relevant differences were that the control infants presented a higher weight at birth and a lower incidence of sepsis. One neonate from the control group (14.3%) suffered from early-onset sepsis, whereas late-onset sepsis was microbiologically or

Table 1. Clinical and demographic characteristics of the preterm infants of both groups.

Characteristic	Control Group (7 infants)	Outbreak Group (12 infants)	p value
Weight at birth (g)	1462 (720–1890) ^a	971 (600–1537) ^a	0.009
Gestational Age (weeks)	30 (25–31) ^a	28 (25–31) ^a	0.26
Vaginal delivery (n, %)	5, 71.4%	3, 25%	0.04
Male sex (n, %)	5, 71.4%	2, 16.6%	0.0001
Sepsis (n, %)	1, 14.3%	6, 50%	0.04
Length of stay (days)	14 (5–140) ^a	55 (7–89) ^a	0.1

^aValues expressed as the median value and the range (between parentheses).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.t001>

clinically diagnosed in five neonates from the outbreak group (41.7%), being *Staphylococcus epidermidis* and *S. marcescens* the microorganisms implicated. Data on antimicrobial therapy were only available for the outbreak group and were included the administration of prophylactic cefazolin during labor (10 infants), empiric treatment based on ampicillin, gentamicin, and clarithromycin during the first week of life (8 infants), and treatment that included vancomycin (7 infants), cefotaxime (2 infants) piperacillin/tazobactam (2 infants), meropenem (1 infant), and amikacin (3 infants) for the second and third weeks of life.

Gut microbiota establishment by next-generation sequencing

The number of operational taxonomic units (OTUs) and the alpha diversity indexes of the meconium samples were similar to the further fecal samples (Fig 1), indicating a delayed bacterial establishment process. LEfSe analysis allowed us to explore the differences in microbiota composition between the control and the outbreak groups for the four variables stated above (epidemiological situation, delivery mode, gestational age, and birth weight).

Significant differences in the gut microbiota composition of the control and outbreak groups were detected in meconium and in the day 21 samples and were more relevant in those found at day 21 ($p = .0024$ at the genus level and $p = .073$ at the phylum level) (Fig 2). The outbreak group was characterized by a higher proportion of γ -Proteobacteria, related to a higher density of *Serratia*, and with lower proportions of the Firmicutes and Fusobacteria phyla.

In relation to the delivery mode, differences between vaginal delivery and C-section delivery were only significantly different at day 0 ($p = .0066$ at the genus level and $p = .0363$ at the phylum level) (Fig 3). Significant differences among bacterial communities regarding gestational age and birth weight were not detected.

Taking into account all 55 samples, the predominant phylum during the first weeks of life of the low-weight preterm infants was Proteobacteria (median \pm SD 70.1% \pm 26.9%, range 0.3%–99.4%), followed by Firmicutes (median \pm SD 22.1% \pm 26.8%; range 0.05–99.4); and although up to another 23 phyla were detected, their contribution was nearly anecdotic (Fig 4A). At the genus level, the abundance of *Escherichia/Shigella* sp. increased over the studied period while that of *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. decreased (Fig 4B).

Reads accounting for the predator bacteria *Bdellovibrio* (2 infants), *Peredibacter* (1 infant), and *Vampirovibrio* (1 infant) were found in meconium samples from the outbreak (3 infants) and the control (1 infant) groups. The relative abundance of predatory species was extremely low (0.004%–0.11%), and none could be detected in the subsequent fecal samples.

Serratia was detected in the meconium samples from all the patients in the outbreak group (median value, 5558 OTUs), whereas this genus was considerably less abundant among the meconium samples from the control group (median value, 180 OTUs) (Table 2). Also noticeable was

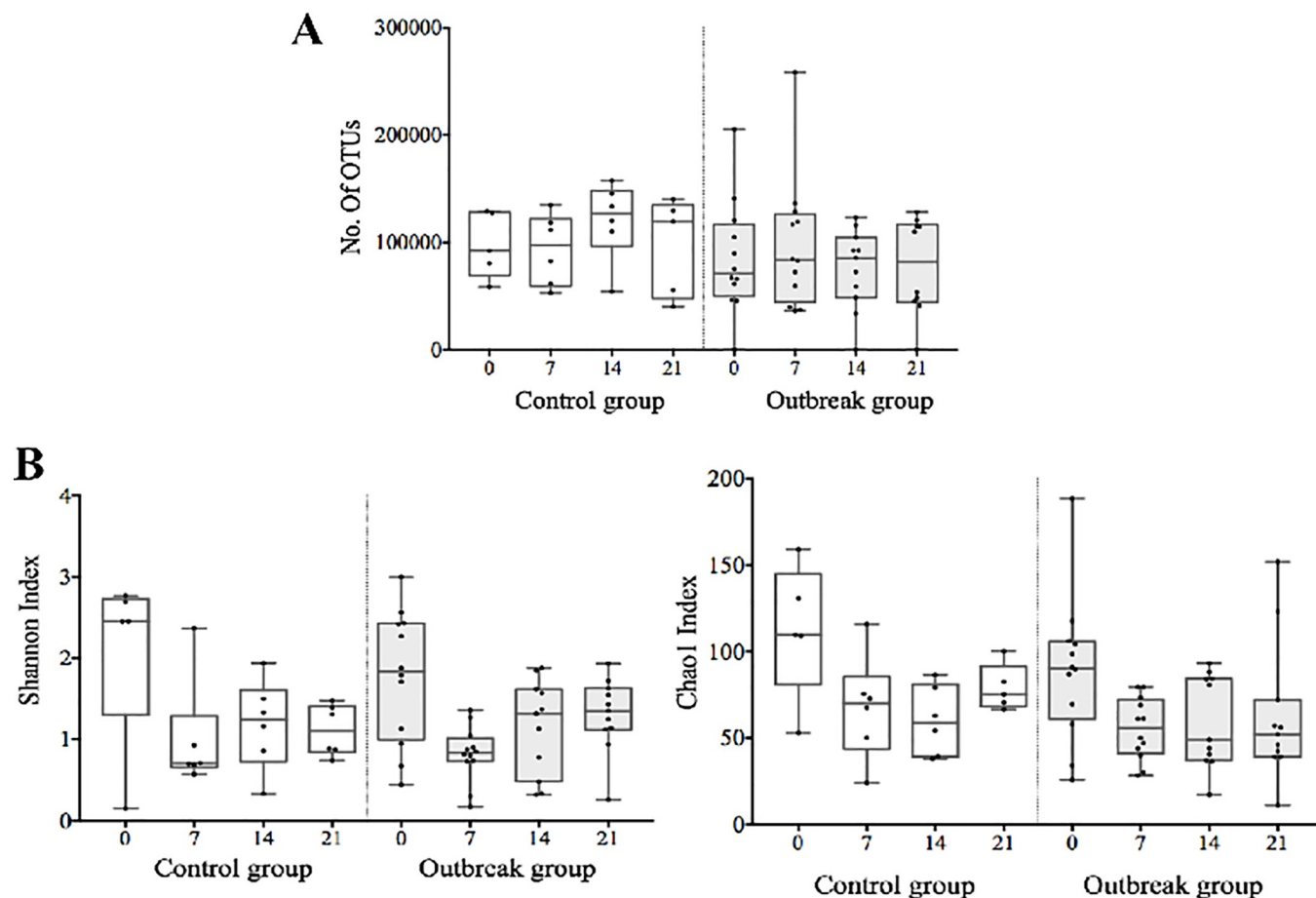


Fig 1. Number of operational taxonomic units (OTUs) (A), and alpha diversity measured by the Chao1 index (B) in all samples studied.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.g001>

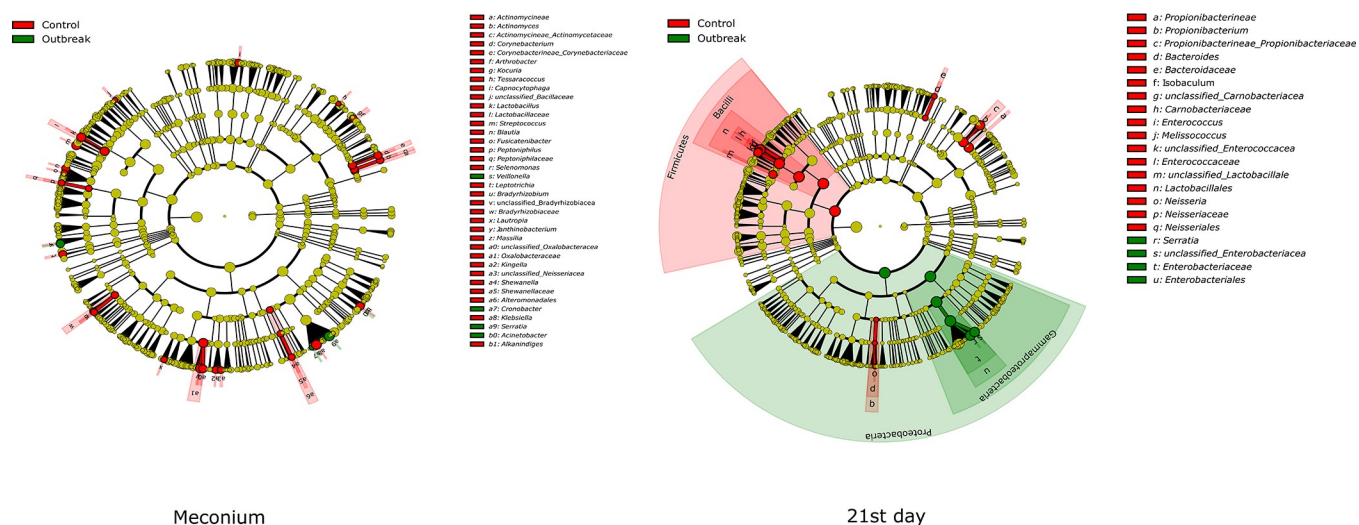


Fig 2. Cladograms showing the significant differences of gut microbiota composition in meconium and 21 days feces between control and outbreak groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.g002>

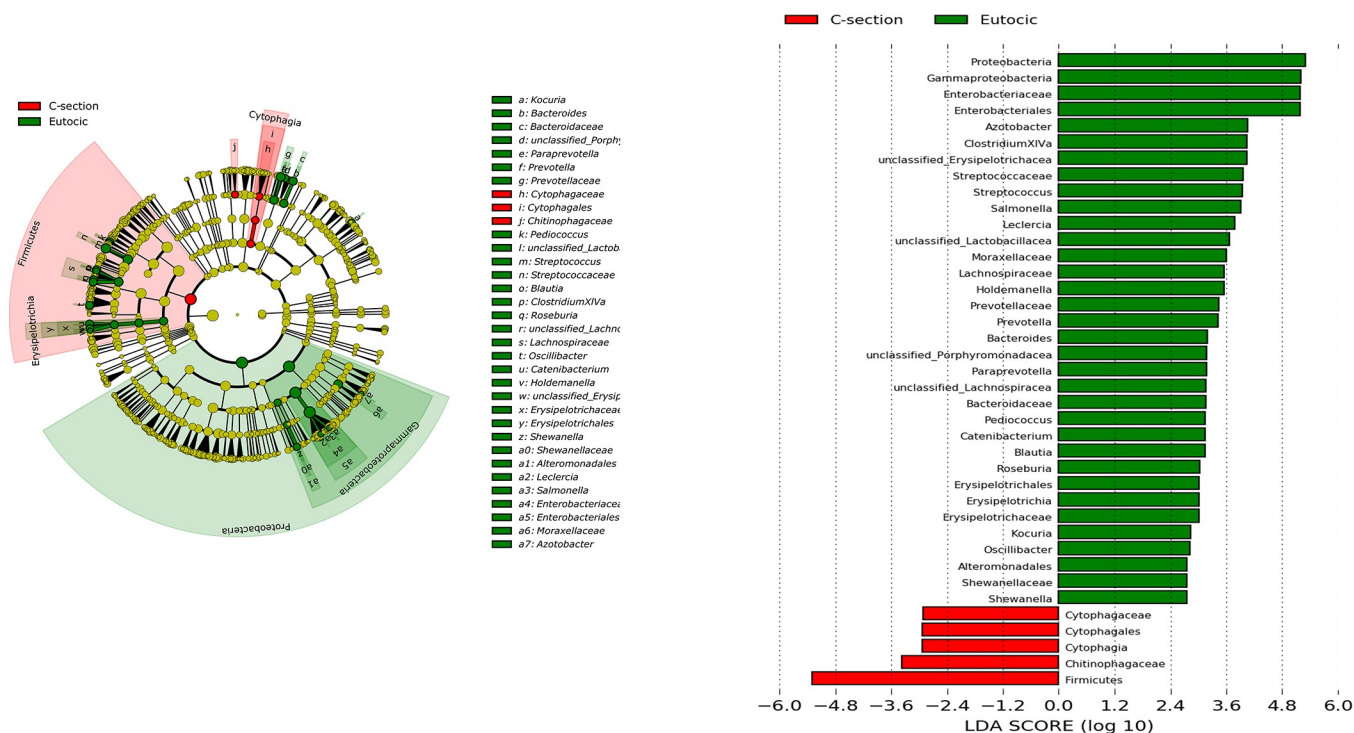


Fig 3. Significant differences in the gut microbiota of meconium by the delivery mode.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.g003>

that the *Serratia* reads considerably increased just before the diagnosis of *Serratia* sepsis in some patients from the outbreak group, and particularly in infant O11, who finally died from *S. marcescens* sepsis at day 10 after birth. The gut enrichment of *Serratia* sequences in this infant was manifest, reaching levels of 95% of the total intestinal microbiota at day 7 (Table 2).

Characterization of cultivable isolates from the outbreak group

A total of 16 *E. coli* (8 infants), 35 *Enterococcus faecalis* (11 infants), 2 *Enterococcus faecium* (1 infant), 12 *Klebsiella oxytoca* (7 infants), 6 *Klebsiella pneumoniae* (5 infants), 32 *S. epidermidis* (all 12 infants), 1 *Serratia liquefaciens* and 14 *S. marcescens* (8 infants) isolates were recovered. Regarding the meconium samples, the cultivable microorganisms were *S. epidermidis* (7 infants), *E. faecalis* (3 infants), and *S. marcescens* (2 infants). Only four meconium samples (33.3%) did not yield viable microorganisms. PFGE analysis showed that isolates recovered from different samples from the same infant were identical or closely related (Fig 5).

Similarly, a single *E. faecalis* pulsotype was detected, colonizing three infants and two major clones of *K. pneumoniae* in two infants. Among the *Serratia* isolates, two genetically unrelated clones were detected, affecting four and five infants each. The relative abundance of *Serratia* in the gut microbiota of each infant is presented in Table 2, which compares both next-generation sequencing (NGS) and microbiological culture techniques. It shows the high counts of *Serratia* in all samples from the outbreak group, confirming the results previously observed in the NGS analysis.

WGS of *Serratia* clones

Four *Serratia* isolates representing the two dominant PFGE clones associated with sepsis in the outbreak group were submitted to WGS (Fig 6). The genome analysis confirmed two

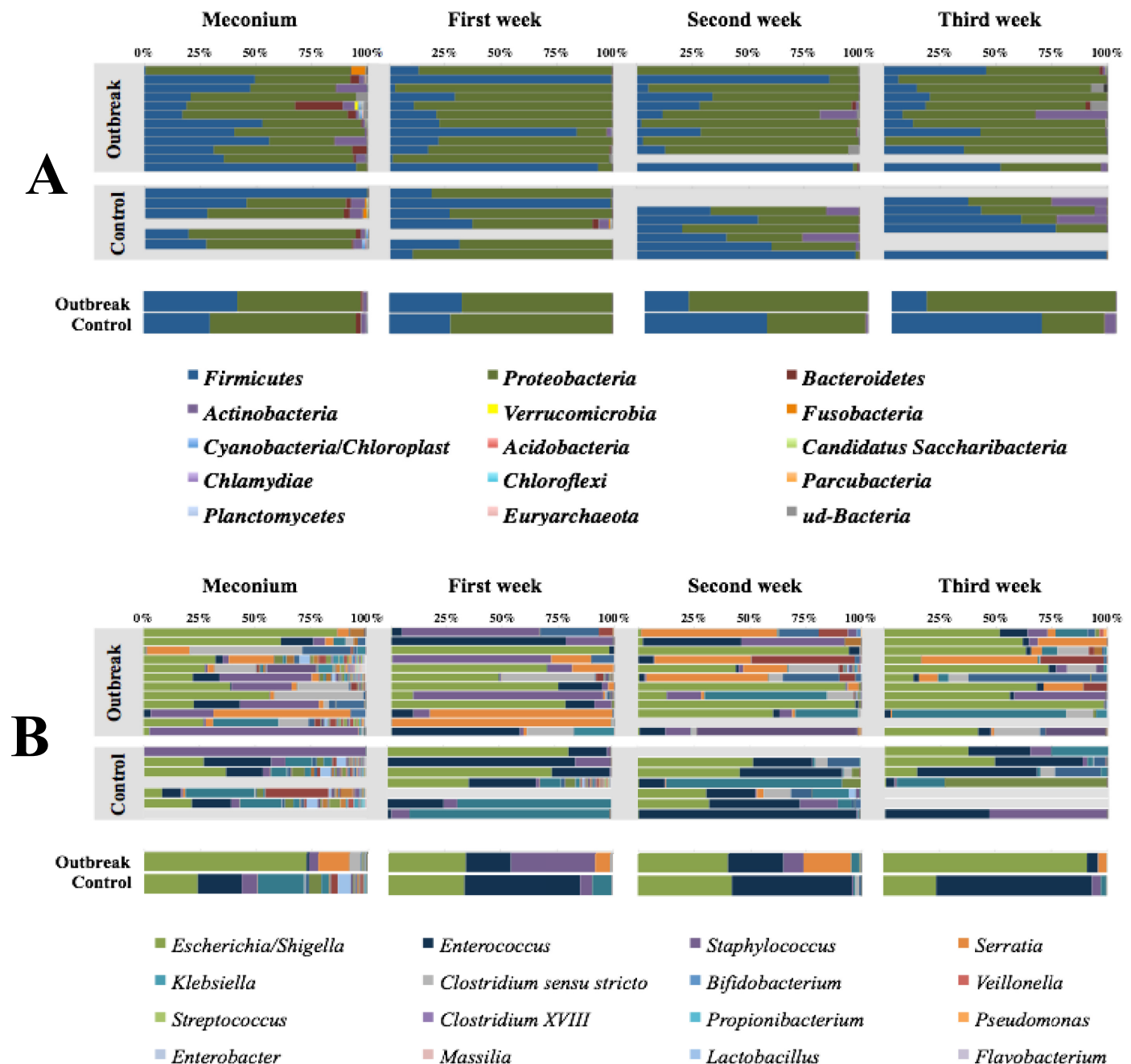


Fig 4. (A) Phyla percentage in each sample and infant, and summary of both groups expressed as the medians values. (B). Genera percentage in each sample and infant, and summary of both groups expressed as the median values. The 16 most abundant genera are highlighted in the figure, although up to 215 genera were detected in the samples analyzed in this study.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.g004>

phylogenetic lineages unrelated to others previously published. It is important to note that the isolate causing the sepsis and death of infant O11 was identical to the isolate obtained from infant O7, who had a satisfactory clinical evolution. WGS allowed the characterization of the resistome (*aac(6')*-Ic-1, *bla*_{SRT-2-1}, *bla*_{SRT-1-1}, and *qnrE*) and the virulome (*cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *flgB*, *flgC*, *flgG*, *flgL*, *flhA*, *flhC*, *flhD*, *fliA*, *fliG*, *fliI*, *fliM*, *fliN*, *fliP*, *fliQ*, and *fliZ*), which

Table 2. *Serratia* abundance detected by molecular tools and distribution of the two major clones detected in the outbreak group. The underlined isolates were submitted to whole genome sequencing. High abundance of *Serratia* by NGS is marked in light grey color, whereas the dark grey means a clear dominance of the *Serratia* genera.

	INFANT	Meconium		Day 7		Day 14		Day 21	
		Cultivable	NGS (%)	Cultivable	NGS (%)	Cultivable	NGS (%)	Cultivable	NGS (%)
OUTBREAK GROUP	O1	<u>Clone A</u>	5.4		0.002		12.1		1.0
	O2		12.4		0.003		0.2		1.7
	O3		2.5	Clone B	17.3		19.0		
	O4		2.4	Clone B	2.4	Clone B	4.8		16.9
	O5		1.8		0.003		0.04	Clone A	28.8
	O6		11.8	Clone B	5.1	Clone B	26.5	Clone B	37.4
	O7		2.9	<u>Clone B</u>	0.2		35.5		4.9
	O8		1.9		0.7		1.3		0.02
	O9		2.0		0.004		0.004		0.006
	O10	<u>Clone A</u>	59.5	Clone A	78.5	Clone A	0.8	Clone A	0.4
	O11		3.1	<u>Clone B</u>	94.5				
	O12		0.3	Clone A	1.3		0.1		1.2
CONTROL GROUP	C1		0.004		0.005				0.008
	C2		0.006		0.001		0.001		0.006
	C3		0.1		0.0007		0		0
	C4				0.06		0.2		0.01
	C5		0.8				3.1		
	C6		0.06		0		0		
	C7				0.0008		0		0.002

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.t002>

was uniform in all four isolates. Nevertheless, our isolates remained susceptible to most antibiotics, given the resistant genes detected were located on the chromosome and not transferable.

Fungi detection

PCR-DGGE yielded positive amplifications in infant 6 (days 21 and 28) and infant 8 (days 14 and 21), and the nucleotide sequences of these amplicons corresponded to *Candida albicans*.

Discussion

In the present study, we have described the succession of the gut microbiota composition from meconium to the first 3 weeks of life of low-weight preterm infants, comparing two epidemiological scenarios from the same NICU. The primary result of our work is related to the *S. marcescens* outbreak influence on infant gut microbiota patterns, including meconium, which might have been modified even before birth in relation to the hospital admission of mothers to prevent premature birth. Although there is marked inter-individual variability, the gut microbiota of low-weight premature infants is dominated by *Proteobacteria phylum*, particularly *E. coli*. Moreover, the expected bacterial ecosystem expansion after birth appears to be delayed, probably in relation to antibiotic exposition. In that sense it is important to remark the data lack about antibiotic prescription on the control group, that represent an important limitation of our work.

Regarding to the outbreak group, all but two infants received empiric antibiotics immediately after birth, and most required culture-guided antibiotic treatments during their admittance, including up to three different antimicrobial families. However, the high incidence of infectious complications among preterm neonates is the main argument used to justify the

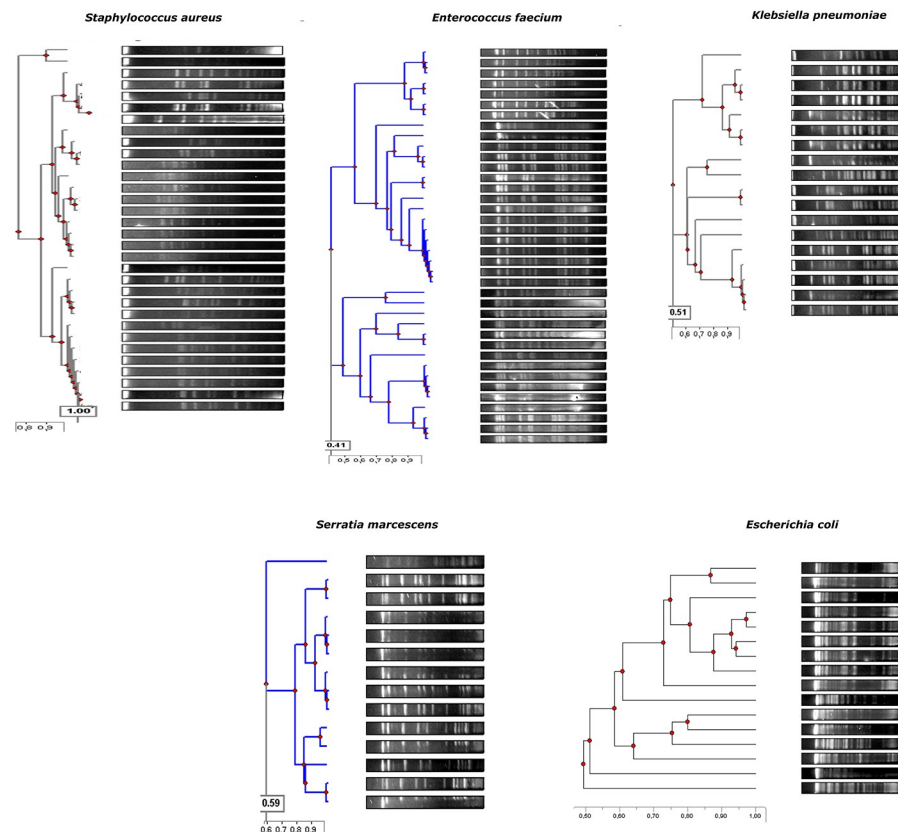


Fig 5. Dendrogram showing the genetic relationship among the cultivable isolates based on the Dice's coefficient.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.g005>

wide empiric and culture-guided use of antimicrobials in preterm infants, particularly in those with low birth weight, as in our case. Early biomarkers of preterm sepsis, together with the development of microbiome-based approaches, are urgently required to reduce antibiotic use in NICUs [28–29].

Prematurity is the main cause of neonatal morbidity and mortality, and the establishment of an adequate gut microbiota appears to be one of the most promising strategies to improve preterm infants' health and to reduce the impact of sequelae later in life [30–31]. Preterm infants admitted to an NICU have a high risk of infection, and *S. marcescens* is one of the most relevant nosocomial pathogens;²³ their intestinal carriage has been identified as a potential reservoir [32].

Our results demonstrated considerable *Proteobacteria* enrichment in both preterm infant groups, although the enrichment was significantly higher in the outbreak group from the second week of life, in concordance with other authors [33–36]. Previous studies found that *Proteobacteria* (mostly *Enterobacter* and *Photobacterium*), *Firmicutes* (mostly *Enterococcus* and *Lactobacillus*), and *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*) dominated the microbial composition of meconium [37]. *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., and a high rate of facultative anaerobes also commonly appear in the meconium of preterm neonates [38–39]. Our study demonstrated significant differences between the control group dominated by *E. coli* and *Enterococcus* and the outbreak group with higher densities of *E. coli* and *Serratia*. Recent data have shown that current 16S rDNA technology is not applicable for the gut ecosystem of premature infants [40]; this is an important limitation of our work, probably showing lower

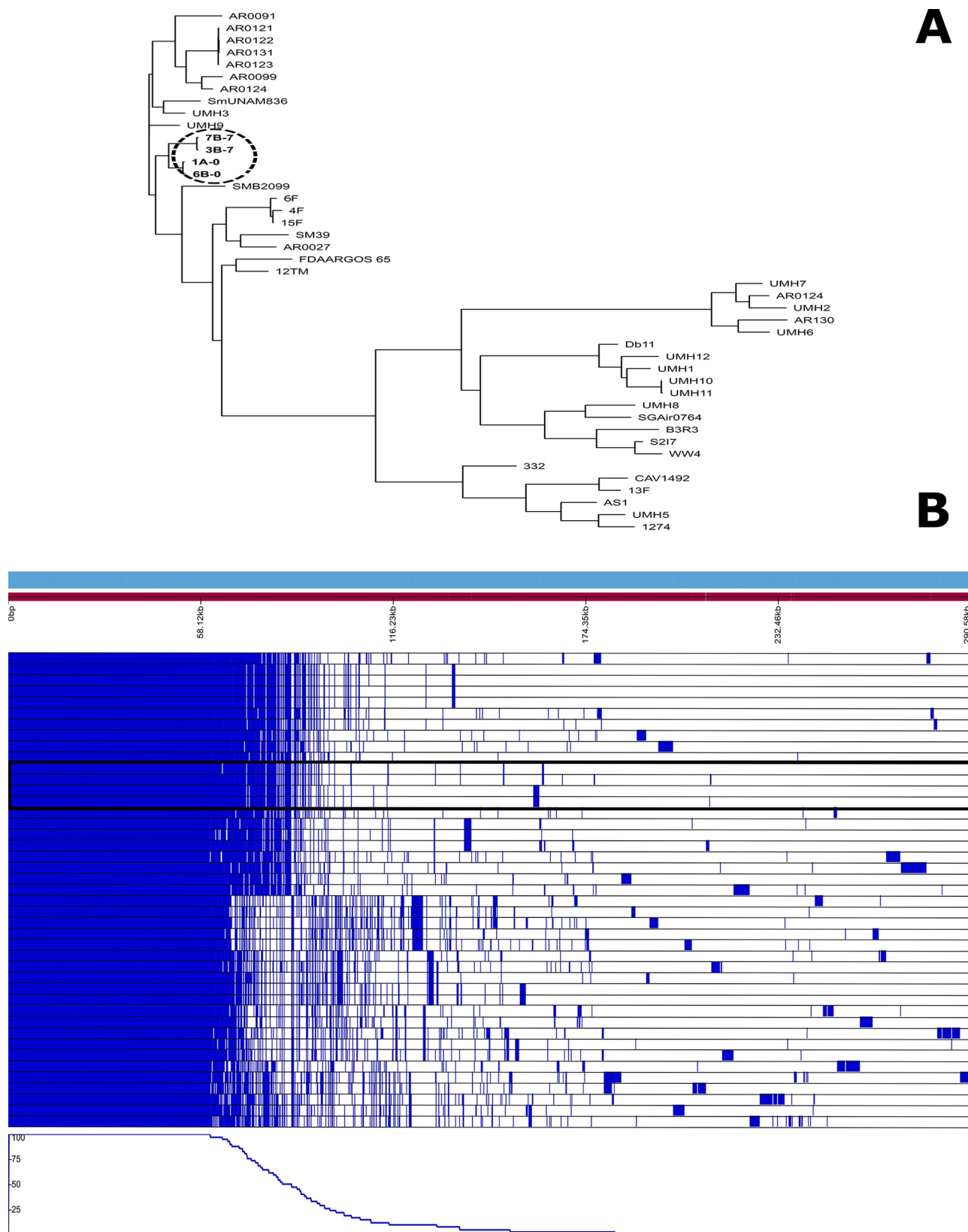


Fig 6. Phylogenic representation of the 4 *S.marcescens* genomes sequenced in this study and comparison with other 32 public *S. marcescens* genomes (A). The second part of the figure (B) represents the common core of all 36 genomes versus the isolate-specific genes. Our 4 isolates grouped together in both analysis and are marked.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216581.g006>

detection of the *Bifidobacterium* population. A recent work also demonstrated that *Bifidobacterium* density is related to the gestational age [12].

Curiously, the meconium samples from both groups were characterized by high interindividual variability and similar alpha diversity as the subsequent fecal samples, pointing to a marked delay in the establishment of the ecosystem. Similar results have been reported in very-low-birth-weight preterm infants [17]. Other authors have described an increase of fecal microbiota complexity during the NICU stay [41].

Although intrauterine fetal gut colonization is still a controversial issue [6–8], the detection of the *Serratia* microorganism in meconium samples suggests the possibility that its preterm colonization could start before birth. Most of the mothers in our study (7 of 12) were admitted to prevent a premature birth by various causes for a median period of 9 days before birth, with a range from 1 to 49 days. In contrast, the mother whose infant died from *S. marcescens* sepsis was admitted only on the day before delivery. Whereas this microorganism was scarcely represented in the meconium, it was very dominant at day 7, a fact that probably preceded the blood translocation and the sepsis episode that occurred at day 10. Therefore, a systematic routine exploration for potential enrichment of specific gut bacterial populations could possibly contribute to prevention of bacteremia in susceptible groups of patients, such as preterm infants. Recently, a novel functional methodology using volatile organic compounds as biomarkers for early detection of gut bacterial enrichment was reported [42]. Our results also demonstrated that some epidemic microorganisms, such as *S. marcescens*, are able to colonize and eventually infect preterm neonates even when state-of-the-art preventive measures have been applied. The PFGE analysis grouped isolates colonizing the 12 infants in the outbreak group into two major clones, whereas the WGS revealed a close relationship between them, suggesting the existence of a common ancestor. These molecular techniques also revealed that the virulome of the strain causing bacteremia and death was identical to other strains with clinical successful evolution, reinforcing the hypothesis that the unclear barrier delimiting colonization from infection is influenced by numerous factors.

Some OTUs assigned to the mandatory predator bacteria *Bdellovibrio*, *Vampirovibrio*, and *Peredibacter* were detected in the three meconium samples analyzed in this study. Such bacteria need to predate other bacteria to grow and reproduce and are considered to be important ecological balancers of the microbial communities [43]. Few studies have focused on these bacteria in human ecosystems; however, their presence in meconium samples suggests that they might not be infrequent in the gut microbiota. A predator's inoculation could represent an ecological tool to modulate bacterial communities, taking into account predator-prey specificity [44].

The preterm nutrition policy of the hospital specifies neonates be fed maternal milk, although this is typically combined with human milk from donors and with preterm-adapted formulas. All the participating preterm infants received all three types of milk during the study, and although such data are not detailed, we are aware that this factor also influences the gut microbiota establishment. Maternal milk can reshape the infant gut microbiota [9], contributing its own site-specific microbiota [45–47], but also promoting the increase of a precise population by its prebiotic action [48]. Thus, it would be suitable to include in the microbiota profiling scheme the differentiation between living and dead bacteria in order to identify real colonizers from casual bacterial passengers associated with food intake [49].

Globally, our results indicate that, regardless of their perinatal settings, preterm neonates admitted to the same NICU are initially colonized by similar microbial communities that later evolve according to individual conditions. A *Serratia* outbreak influence on the establishment of the gut microbiota appears to be universal from the first days of admission; however, our results might also be applied to outbreaks caused by other microorganisms. This highlights the importance of the environment regarding the pattern of gut colonization of hospitalized pre-term infants.

Supporting information

S1 Dataset. Supplementary clinical data.
(XLSX)

Acknowledgments

The author would like to thank Dr. Manuel Ponce-Alonso for his helpful with genomes analysis.

Author Contributions

Conceptualization: Esperanza Escribano, Claudia Saralegui, Juan Miguel Rodríguez, Miguel Sáenz de Pipaón, Rosa del Campo.

Data curation: Laura Moles.

Formal analysis: Claudia Saralegui, María Teresa Montes, Claudio Alba, Teresa Alarcón, Fernando Lázaro-Perona.

Funding acquisition: Miguel Sáenz de Pipaón.

Investigation: Esperanza Escribano, Claudia Saralegui, Laura Moles, María Teresa Montes.

Methodology: Claudio Alba, Teresa Alarcón, Rosa del Campo.

Project administration: Juan Miguel Rodríguez.

Supervision: Miguel Sáenz de Pipaón, Rosa del Campo.

Validation: Teresa Alarcón, Fernando Lázaro-Perona.

Writing – original draft: Rosa del Campo.

Writing – review & editing: Juan Miguel Rodríguez, Miguel Sáenz de Pipaón.

References

1. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota: masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013, 11:227–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974> PMID: 23435359
2. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016, 65:330–9. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990> PMID: 26338727
3. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med.* 2016, 375:2369–79. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1600266> PMID: 27974040
4. Walker WA. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. *Pediatr Res.* 2017, 82:387–95. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.111> PMID: 28426649
5. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012, 9:565–76. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.144> PMID: 22890113

6. Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017, 5:48. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4> PMID: 28454555
7. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014, 6(237). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599> PMID: 24848255
8. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017, 81(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17> PMID: 29118049
9. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015, 17:690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004> PMID: 25974306
10. Madan JC, Farzan SF, Hibberd PL, Karagas MR. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. *Curr Opin Pediatr*. 2012, 24:753–9. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32835a1ac8> PMID: 23111681
11. La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, Weinstock GM, Sodergren E, Hall-Moore CM, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111:12522–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409497111> PMID: 25114261
12. Chernikova DA, Madan JC, Housman ML, Zain-UI-Abideen M, Lundgren SN, Morrison HG, et al. The premature infant gut microbiome during the first 6 weeks of life differs based on gestational maturity at birth. *Pediatr Res*. 2018, 84:71–9. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0022-z> PMID: 29795209
13. Blencowe H, Cousens S, Chou D, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health*. 2013, 10:Suppl:S2.
14. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Oestergaard M, Say L, Moller AB, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*. 2012, 379:2162–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60820-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60820-4) PMID: 22682464
15. Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L, et al. Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. *BJOG*. 2013, 120:1356–65. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12281> PMID: 23700966
16. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015, 112:11060–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502875112> PMID: 26283357
17. Patel AL, Mutlu EA, Sun Y, Koenig L, Green S, Jakubowicz A, et al. Longitudinal survey of microbiota in hospitalized preterm very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016, 62:292–303. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000913> PMID: 26230901
18. Unger S, Stintzi A, Shah P, Mack D, O'Connor DL. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatr Res*. 2015, 77:205–13. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.162> PMID: 25310760
19. Moles L, Gómez M, Jiménez E, Fernández L, Bustos G, Chaves F, et al. Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration 2 years later. *Clin Microbiol Infect*. 2015, 21:936.e1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.003> PMID: 26086569
20. Elgin TG, Kern SL, McElroy SJ. Development of the neonatal intestinal microbiome and its association with necrotizing enterocolitis. *Clin Ther*. 2016, 38:706–15. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.01.005> PMID: 26852144
21. Groer MW, Gregory KE, Louis-Jacques A, Thibeau S, Walker WA. The very low birth weight infant microbiome and childhood health. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015, 105:252–64. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21115> PMID: 26663857
22. Yusef D, Shalakhti T, Awad S, Algharaibeh H, Khasawneh W. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: A retrospective review. *Pediatr Neonatol*. 2017, 59:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.06.001> PMID: 28642139
23. Martineau C, Li X, Lalancette C, Perreault T, Fournier E, Tremblay J, et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit (NICU): new insights from next-generation sequencing applications. *J Clin Microbiol*. 2018, 27; 56(9). pii: e00235–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00235-18> PMID: 29899005
24. Johnson J, Quach C. Outbreaks in the neonatal ICU: a review of the literature. *Curr Opin Infect Dis*. 2017, 30:395–403. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000383> PMID: 28582313
25. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013, 41:1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>

26. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011, 12:R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60> PMID: 21702898
27. Liu J, Yu Y, Cai Z, Bartlam M, Wang Y. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015, 31:1387–95. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1890-6> PMID: 26081603
28. Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome.* 2014, 2:38. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-38> PMID: 25332768
29. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018, 31:1646–59. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1322060> PMID: 28427289
30. Ruiz L, Moles L, Gueimonde M, Rodriguez JM. Perinatal microbiomes' influence on preterm birth and preterms' health: influencing factors and modulation strategies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016, 63:e193–e20. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001196> PMID: 27019409
31. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol.* 2017, 43:352–69. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1211088> PMID: 27931152
32. Montagnani C, Cocchi P, Lega L, Campana S, Biermann KP, Braggion C, et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants. *BMC Infect Dis.* 2015, 15:11. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0734-6> PMID: 25582674
33. Cong X, Xu W, Janton S, Henderson WA, Matson A, McGrath JM, et al. Gut microbiome developmental patterns in early life of preterm infants: impacts of feeding and gender. *PLoS One.* 2016, 11:e0152751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152751> PMID: 27111847
34. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O'Shea CA, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome.* 2017, 5:4. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0213-y> PMID: 28095889
35. Underwood MA, Sohn K. The microbiota of the extremely preterm infant. *Clin Perinatol.* 2017, 44:407–27. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2017.01.005> PMID: 28477669
36. Nogacka A, Salazar N, Suárez M, Milani C, Arboleya S, Solís G, et al. Impact of intrapartum antimicrobial prophylaxis upon the intestinal microbiota and the prevalence of antibiotic resistance genes in vaginally delivered full-term neonates. *Microbiome.* 2017, 5:93. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0313-3> PMID: 28789705
37. Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH, Stevenson M, et al. First-pass meconium samples from healthy term vaginally-delivered neonates: an analysis of the microbiota. *PLoS One.* 2015, 10:e0133320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133320> PMID: 26218283
38. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One.* 2014, 9:e90784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090784> PMID: 24614698
39. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One.* 2013, 8:e66986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066986> PMID: 23840569
40. Alcon-Giner C, Caim S, Mitra S, Ketskemety J, Wegmann U, Wain J, et al. Optimisation of 16S rRNA gut microbiota profiling of extremely low birth weight infants. *BMC Genomics.* 2017, 18:841. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4229-x> PMID: 29096601
41. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr.* 2011, 158:390–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.09.007> PMID: 20961563
42. Berkhout DJC, van Keulen BJ, Niemark HJ, Bessem JR, de Boode WP, Cossey V, et al. Late-onset sepsis in preterm infants can be detected preclinically by fecal volatile organic compound analysis: a prospective, multicenter cohort study. *Clin Infect Dis.* 2018, Jun 21, *In press.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciy383> PMID: 29931245
43. Iebba V, Santangelo F, Totino V, Nicoletti M, Gagliardi A, De Biase RV, et al. Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One.* 2013, 8:e61608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061608> PMID: 23613881
44. Kadouri DE, To K, Shanks RMQ, Doi Y. Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant gram-negative pathogens. *PLoS One.* 2013, 8:e63397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063397> PMID: 23650563

45. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013, 69:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001> PMID: 22974824
46. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr.* 2017, 171:647–54. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0378> PMID: 28492938
47. Macpherson AJ, de Agüero MG, Ganai-Vonarburg SC. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017, 17:508–17. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.58> PMID: 28604736
48. Moukarzel S, Bode L. Human milk oligosaccharides and the preterm infant: a journey in sickness and in health. *Clin Perinatol.* 2017, 44:193–207. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.014> PMID: 28159206
49. Young GR, Smith DL, Embleton ND, Berrington JE, Schwalbe EC, Cummings SP, et al. Reducing viability bias in analysis of gut microbiota in preterm infants at risk of NEC and sepsis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017, 7:237. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00237> PMID: 28634574